

**PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN D TERHADAP
PENURUNAN JUMLAH TROMBOSIT PADA MENCIT MODEL
*ULCERATIVE COLITIS (UC)***

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh gelar Sarjana Kedokteran**



**Oleh :
Hilma Hanifiati
NIM 165070100111050**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
BAB 1	1
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Akademis	5
1.4.2 Manfaat Praktis.....	6
BAB 2	7
TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 <i>Ulcerative Colitis</i>	7
2.1.1 Definisi	7
2.1.2 Epidemiologi.....	7
2.1.3 Etiologi	8
2.1.4 Patofisiologi	9
2.1.5 Gejala dan Diagnosis.....	10
2.1.6 Terapi <i>Ulcerative Colitis</i>	13

2.2 Trombosit	15
2.2.1 Morfologi Trombosit	15
2.2.2 Fungsi Trombosit.....	16
2.2.3 Kelainan Trombosit	16
2.2.4 <i>Thrombopoiesis</i>	18
2.3 <i>Dextran Sulphate Sodium (DSS)</i>	21
2.4 Vitamin D	21
BAB 3	25
KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	25
3.1 Kerangka Konsep	25
3.2 Uraian Kerangka Konsep.....	26
3.3 Hipotesis Penelitian	27
BAB 4	28
METODE PENELITIAN.....	28
4.1 Desain Penelitian	28
4.2 Sampel Penelitian	28
4.2.1 Pemilihan Sampel	28
4.2.2 Besar Sampel	29
4.3 Variabel Penelitian.....	30
4.3.1 Variabel Bebas	30
4.3.2 Variabel Tergantung	30
4.4 Waktu dan Tempat Penelitian.....	30
4.4.1 Waktu Penelitian.....	30
4.4.2 Tempat Penelitian	30
4.5 Definisi Operasional	30
4.6 Alat dan Bahan Penelitian	31
4.6.1 Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Mencit.....	31
4.6.2 Alat dan Bahan untuk Sonde Vitamin D	31
4.6.3 Alat dan Bahan untuk Induksi Ulcerative Colitis.....	31
4.6.4 Alat dan Bahan untuk Pengambilan Sampel Darah	31
4.7 Prosedur Kerja Penelitian.....	32
4.7.1 Pengelolaan dan Pemeliharaan Mencit.....	32
4.7.2 Proses Induksi Vitamin D.....	33

4.7.3 Proses Induksi <i>Ulcerative Colitis</i>	33
4.7.4 Pengukuran Berat Badan dan Pengecekan Feses Mencit.....	33
4.7.5 Pengambilan Sampel Darah Mencit.....	34
4.7.6 Perlakuan Mencit Setelah Pengambilan Sampel.....	34
4.8 Pemeriksaan Jumlah Trombosit	34
4.9 Analisis Data	35
4.10 Alur Penelitian	36
BAB 5	37
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....	37
5.1 Hasil Penelitian.....	37
5.1.1 Karakteristik Mencit <i>Ulcerative Colitis</i> (UC)	37
5.1.2 Pengaruh Pemberian Vitamin D terhadap Jumlah Trombosit pada Mencit <i>Ulcerative Colitis</i> (UC)	40
5.2 Analisis Data	42
5.2.1 Uji Normalitas	42
5.2.2 Uji Homogenitas	43
5.2.3 <i>One-way ANOVA</i>	43
BAB 6	45
PEMBAHASAN.....	45
6.1 Karakteristik Mencit Model <i>Ulcerative Colitis</i> (UC).....	45
6.1.1 Karakteristik Berat Badan, Konsistensi Feses, dan Perdarahan Feses	45
6.1.2 Karakteristik Trombosit pada Mencit Model <i>Ulcerative Colitis</i> (UC)	47
6.2 Pengaruh Pemberian Vitamin D terhadap Jumlah Trombosit	49
6.3 Keterbatasan Penelitian.....	53
7.1 Kesimpulan	54
7.2 Saran.....	54
DAFTAR PUSTAKA.....	55
LAMPIRAN.....	62

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN D TERHADAP
PENURUNAN JUMLAH TROMBOSIT DALAM DARAH
PADA MENCIT MODEL *ULCERATIVE COLITIS* (UC)**

Oleh:

Hilma Hanifiati

NIM 165070100111050

Telah diuji pada

Hari : Jumat

Tanggal : 29 November 2019

dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

dr. Dian Sukma Hanggara, M.Biomed., Sp.PK

NIP. 198504092009121003

Pembimbing-I/Penguji-II

Pembimbing-II/Penguji-III

dr. Novi Khila Firani, M.Kes., Sp.PK dr. Nugrahanti Prasetyorini, Sp. OG (K)

NIP. 197611022003122001

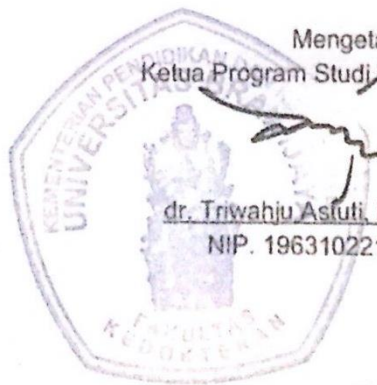
NIP. 196707282003122001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter

dr. Triwahju Asfuti, M.Kes., Sp.P(K)

NIP. 196310221996012001



ABSTRAK

Hanifiati, Hilma. 2019. **Pengaruh Pemberian Vitamin D terhadap Penurunan Jumlah Trombosit Dalam Darah pada Mencit Model Ulcerative Colitis (UC)**. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) dr. Novi Khila Firani, M.Kes, Sp.PK (2) dr. Nugrahanti Prasetyorini, Sp.OG (K).

Ulcerative colitis (UC) merupakan salah satu jenis dari penyakit *Inflammatory bowel disease* (IBD) yang ditandai dengan inflamasi terbatas pada mukosa kolon. Manifestasi klinis dari UC salah satunya adalah trombositosis. Vitamin D memiliki berbagai fungsi salah satunya sebagai anti inflamasi. Penderita UC cenderung memiliki kadar vitamin D yang rendah ditubuh. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian vitamin D terhadap penurunan jumlah trombosit pada mencit model UC dengan studi eksperimental menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Control Group Design* pada mencit BALB/c jantan. Penelitian ini menggunakan 21 sampel dibagi dalam tiga kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, dan kelompok perlakuan yang diberi vitamin D selama 7 hari. Variabel yang diukur adalah trombosit menggunakan *hematology autoanalyzer*. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa ada perbedaan pengaruh yang signifikan pada pemberian vitamin D terhadap penurunan jumlah trombosit pada mencit model UC ($p=0.025$). Hasil uji *Least Significant Difference* (LSD) menunjukkan berbeda signifikan antara kelompok mencit UC tanpa terapi vitamin D dengan kelompok UC yang diberikan terapi vitamin D ($p<0.008$). Dapat disimpulkan bahwa terdapat penurunan jumlah trombosit pada mencit model *ulcerative colitis* (UC) yang diberi terapi vitamin D.

Kata kunci : *ulcerative colitis*, vitamin d, trombosit.

ABSTRACT

Hanifiati, Hilma. 2019. **The Effect of Vitamin D on Decreased the Platelet Count in Blood of Mice Model of Ulcerative Colitis (UC)**. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya. Supervisors : (1) dr. Novi Khila Firani, M.Kes, Sp.PK (2) dr. Nugrahanti Prasetyorini, Sp.OG (K)

Ulcerative colitis (UC) is a form of inflammatory bowel disease characterised by inflammation of the colonic mucosa. One of the clinical manifestations of UC is thrombocytosis. Vitamin D has a variety of functions, one of the effects of vitamin D is an anti-inflammatory. Patients with UC tend to have low levels of vitamin D in the body. This study aimed to determine the effect of vitamin D on decreased the platelet count in mice model of UC with true experimental design by using randomized post test only control group design in male BALB/c. This study using 21 samples that divided by 3 groups: negative control, positive control, and treatment group was given vitamin D for 7 days. The variable measured was platelets by using a hematology autoanalyzer. The results showed that there was a significant difference in the effect of vitamin D administration on decreasing platelet count in mice model of UC ($p=0.0025$). The Least Significant Difference (LSD) test results showed that there are a significant differences between the UC mice group without vitamin D therapy and the UC mice group given vitamin D therapy ($p<0.008$). It can be concluded that there is a decrease in platelet count in mice with ulcerative colitis (UC) models that treated with vitamin D.

Keywords: ulcerative colitis, vitamin d, platelets

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Penyakit *inflammatory bowel disease* (IBD) merupakan gangguan peradangan yang terjadi di usus secara kronis. *Inflammatory bowel disease* terbagi menjadi *ulcerative colitis* (UC) dan *crohn disease* (CD). *Ulcerative colitis* hanya mempengaruhi usus besar dan terjadi secara berkelanjutan serta terutama terbatas pada mukosa. Sebaliknya, *crohn disease* dapat melibatkan komponen saluran gastrointestinal dari rongga mulut ke anus yang terjadi secara tidak berkelanjutan dan umumnya dikaitkan dengan komplikasi seperti abses, fistula, dan striktur (Abraham, 2009 dan Zhang dan Li, 2014).

Sekitar 25% pasien IBD didiagnosis dalam 2 dekade pertama kehidupannya dan sebagian besar didiagnosis pada masa kanak-kanak (sekitar usia 13-18 tahun). Selain itu, penelitian dari berbagai negara menunjukkan bahwa kejadian IBD meningkat terutama pada masa remaja. Insiden UC tertinggi berada di Eropa yaitu 24.3 kasus per 100.000 orang pertahun dan 12.7 kasus per 100.000 orang orang pertahun untuk CD. Sedangkan di Amerika Utara insiden UC tertinggi yaitu 19.2 kasus per 100.000 orang pertahun dan untuk kasus CD yaitu 20.2 kasus per 100.000 orang per tahun. Untuk Asia dan Timur Tengah insiden UC sebesar 6.3 kasus dari 100.000 orang pertahun dan untuk CD yaitu 5.0 kasus per 100.000 orang per tahun. Prevalensi tertinggi untuk UC adalah 505 kasus per 100.000 orang di Eropa, dan 249 per 100.000 orang di Amerika Utara sedangkan untuk prevalensi CD

adalah 322 kasus per 100.000 orang di Eropa, dan 319 kasus per 100.000 orang di Amerika Utara (Ye *et al.*, 2015). Berdasarkan data kolonoskopi dari Rumah Sakit Umum Daerah Saiful Anwar pada tahun 2010 - 2014 didapatkan dari total 2170 pasien yang menjalani kolonoskopi, 176 pasien adalah *ulcerative colitis*. Prevalensi dari UC dari tahun 2010 - 2014 di Rumah Sakit Umum Daerah Saiful Anwar adalah 8.2% (Mustika dan Triana, 2014).

Saat ini, penyebab dari UC secara spesifik masih belum jelas. Namun, diyakini bahwa gangguan pada sistem kekebalan tubuh dan / atau interaksi yang tidak seimbang dengan mikroba menyebabkan perkembangan peradangan usus kronis. Secara umum, sel *T helper 1* (Th1) telah dianggap memainkan peran penting dalam patogenesis yang terkait dengan kronisitas peradangan usus, terutama di dalam *Crohn disease*, sedangkan sel *T helper 2* (Th2) telah dianggap memainkan peran penting dalam *ulcerative colitis* (Cheon, 2017). Patogenesis terjadinya UC karena ketidakseimbangan sitokin pro-inflamasi dan sitokin anti-inflamasi, dimana jumlah sitokin pro-inflamasi pada pasien dengan UC mengalami peningkatan. Salah satu sitokin pro-inflamasi yang berperan dalam UC adalah Interleukin-6 (IL-6). Interleukin-6 mempunyai fungsi dalam mengaktivasi megakariosit untuk meningkatkan produksi trombosit yang tinggi di darah (Zhang, 2014; Vandoukis *et al.*, 2013). Jumlah trombosit yang meningkat telah diusulkan sebagai biomarker aktivitas penyakit UC pada manusia. Trombositosis yang disertai dengan adanya trombosit *immature* dalam darah, menunjukkan bahwa respon terhadap UC terkait dengan *thrombopoiesis* yang dipercepat. Karena trombosit *immature* diketahui hiper-reaktif terhadap stimulasi agonis, sehingga pada pasien IBD sering terjadi pembentukan

trombus. Trombus tersebut dapat menyebar secara ekstra intestinal melalui sirkulasi arteri dan vena dan biasanya dimanifestasikan sebagai *deep vein thrombosis* (DVT) atau sebagai emboli paru (Yan SL *et al.*, 2013). Trombosis yang diakibatkan oleh pembentukan trombus tersebut dikaitkan dengan angka kematian yang tinggi (Andrade *et al.*, 2018).

Prevalensi defisiensi vitamin D pada penyakit radang usus sangat bervariasi. Pada pasien-pasien dengan penyakit radang usus biasanya memiliki kadar vitamin D yang rendah, hal tersebut dikaitkan dengan fungsi dari vitamin D yaitu regulasi sistem imun (Blanck dan Abera, 2013). Vitamin D merupakan vitamin yang larut lemak. Dua bentuk utamanya adalah vitamin D2 dan vitamin D3. Vitamin D2 (*ergocalciferol*) sebagian besar buatan manusia dan ditambahkan pada makanan, sedangkan vitamin D3 (*cholecalciferol*) disintesis di kulit manusia dari 7-*dehydrocholesterol* dan juga dikonsumsi dalam makanan melalui asupan makanan berbasis hewani. Bentuk aktif dari vitamin D adalah *calcitriol* (1,25-*dihydroxyvitamin* D3) (Bikle, 2014). Bentuk aktif vitamin D (1,25 (OH)₂D₃) diketahui dapat menekan aktivitas inflamasi, menginduksi aktivitas antibakteri, dan mengatur produksi sitokin dalam mendukung respon anti-inflamasi (Reich *et al.*, 2014).

Pada penelitian sebelumnya, hewan coba model UC didapat dari induksi *dextran sulphate sodium* (DSS). Molekul DSS mengakibatkan kerusakan pada epitel *monolayer* yang melapisi usus besar yang memungkinkan penyebaran infeksi ke dalam jaringan di bawahnya (Chassaing, 2014). Hal tersebut dikarenakan defek integritas *barrier* epitel sehingga terjadi peningkatan permeabilitas mukosa kolon yang menyebabkan molekul besar seperti DSS dapat masuk. Jika DSS telah

berhasil menginduksi kolitis maka akan muncul adanya peningkatan kadar sitokin pro inflamasi seperti *tumor necrosis factor alpha* (TNF α), Interleukin 1 β (IL-1) β , interleukin-6 (IL-6), dan interleukin 17 (IL-17) serta akan terjadi penurunan berbagai sitokin anti-inflamasi seperti interleukin-10 (IL-10) dan *transforming growth factor-beta* (TGF β) (Perse dan Cerar, 2012; Randhawa *et al.*, 2014).

Pengobatan UC khususnya lini pertama yaitu *5-aminosalisilat* (5-ASA) sebagai anti inflamasi memiliki efek samping yang cukup banyak, seperti diare berair oleh karena cara kerja obatnya adalah meningkatkan sekresi air dan elektrolit dari ileum. Efek samping yang berat berupa toksisitas paru, perikarditis, hepatitis, pankreatitis, dan anemia aplastik. Penggunaan steroid lebih dari dua minggu harus dikurangi dosisnya secara bertahap untuk mencegah hipoadrenalisme. Efek samping utama jangka panjang termasuk hipertensi, diabetes, rentan terhadap infeksi, dispepsia, peningkatan berat badan, dan osteoporosis. Akibat osteoporosis ini dapat meningkatkan risiko patah tulang belakang bagi pasien (Garud dan Peppercorn, 2009; Probert, 2013).

Data epidemiologis telah mengaitkan defisiensi vitamin D dengan peningkatan risiko IBD (Limketkai *et al.*, 2016). Vitamin D juga mempunyai peranan penting dalam mengembalikan fungsi dan kerusakan dari mukosa *barrier* usus dengan meningkatkan sekresi protein-protein yang berfungsi untuk meningkatkan ikatan antar *tight junction* yang ada di usus. Dengan beragamnya fungsi dari vitamin D, seharusnya direkomendasikan sebagai terapi untuk pasien IBD, setidaknya dalam bentuk suplemen vitamin D karena dapat menekan aktivitas penyakit dan meningkatkan kualitas hidup penderita UC (Li *et al.*, 2018). Berdasarkan data terkait

penurunan kadar vitamin D pada penderita UC dan efek dari vitamin D terhadap inflamasi, maka penelitian ini akan menguji pengaruh vitamin D terhadap jumlah trombosit pada mencit yang diinduksi DSS.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian vitamin D pada mencit model *ulcerative colitis* berpengaruh terhadap penurunan jumlah trombosit dalam darah?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian vitamin D terhadap penurunan jumlah trombosit dalam darah pada mencit model *ulcerative colitis*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui jumlah trombosit dalam darah pada mencit model *ulcerative colitis* yang diinduksi DSS
2. Mengetahui jumlah trombosit dalam darah pada mencit model *ulcerative colitis* yang diterapi dengan vitamin D
3. Menganalisa pengaruh vitamin D terhadap penurunan jumlah trombosit dalam darah pada mencit model *ulcerative colitis*

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan ilmu pengetahuan agar menjadi dasar ilmiah untuk pengembangan penelitian lebih lanjut, khususnya vitamin D sebagai kandidat terapi untuk *ulcerative colitis*.

1.4.2 Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini dijadikan bahan pertimbangan untuk menggunakan vitamin D sebagai kandidat terapi untuk *ulcerative colitis*.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Ulcerative Colitis*

2.1.1 Definisi

Ulcerative Colitis (UC) adalah salah satu bentuk dari *Inflammatory bowel disease* (IBD) yang ditandai dengan inflamasi kronik terbatas pada mukosa kolon. Keadaan UC ini dapat dikatakan sebagai kondisi inflamasi secara idiopatik pada kolon yang menyebabkan mukosa kolon erosi dan mengalami perdarahan (Lynch dan Hsu, 2017).

2.1.2 Epidemiologi

Ulcerative Colitis merupakan penyakit usus yang lebih sering terjadi dibandingkan dengan *crohn disease* (CD). Baik UC maupun CD sering terjadi di negara Amerika Utara dan Eropa Barat. Sedangkan di Negara Asia terjadi peningkatan insiden dari UC yaitu 1.2 – 20.3 kasus per 100.000 orang per tahun, dengan prevalensi 7.6 – 245 kasus per 100.000 per tahun (Fuerstein dan Cheifetz, 2014).

Berdasarkan data kolonoskopi dari Rumah Sakit Umum Daerah Saiful Anwar pada tahun 2010 - 2014 didapatkan dari total 2170 pasien yang menjalani kolonoskopi, 176 pasien adalah UC. Prevalensi dari UC dari tahun 2010 - 2014 di Rumah Sakit Umum Daerah Saiful Anwar adalah 8.2% (Mustika dan Triana, 2014).

2.1.3 Etiologi

Etiologi dari IBD diduga meliputi banyak faktor, diantaranya adalah faktor genetik, faktor lingkungan atau faktor mikroba, dan ketidakseimbangan dari respon imun. Terkait faktor genetik, UC lebih sering terjadi pada pasien yang berasal dari *Jewish* dibandingkan *non-Jewish* dan lebih jarang terjadi pada *African American* atau *Hispanics* (Zhang, 2014).

Faktor lingkungan yang dapat menyebabkan terjadinya kolitis salah satunya adalah efek penggunaan dari obat aspirin, *nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)*, dan antibiotik. Efek penggunaan obat-obatan tersebut yang jika digunakan dalam jangka waktu yang panjang, lama pemakaian, dan juga menggunakan dosis yang tinggi diduga sangat berkaitan erat menyebabkan UC (Zhang, 2014).

Faktor kelainan sistem imun juga diperkirakan berperan dalam terjadinya UC, dimana terjadinya ketidakseimbangan sistem imun di mukosa kolon sebagai respon terhadap antigen enterik (Meeker *et al.*, 2016). Kelainan sistem imun dapat terjadi pada respon alami maupun adaptif. Respon imun alami merupakan pertahanan pertama dari tubuh saat adanya patogen. Respon alami ini dimediasi oleh sel dendritik, neutrofil, makrofag dan *natural killer cell*. Sedangkan kelainan pada respon imun adaptif merupakan kelainan pada respon seluler yang ditandai dengan adanya diferensiasi dari sel CD4+ yang berlebihan sehingga memicu terjadinya suatu proses inflamasi. Pada keadaan UC diferensiasi sel CD4+ lebih dominan ke arah respon Th2 yang ditandai dengan sel NKT yang mensekresikan Interleukin-13 (IL-13) untuk memediasi terjadinya disfungsi epitel (Zhang, 2014).

2.1.4 Patofisiologi

Patofisiologi dari UC diyakini adalah terjadinya gangguan sistem kekebalan tubuh dan atau interaksi yang tidak seimbang dengan mikroba sehingga mengarah ke perkembangan peradangan usus kronis. Usus memiliki lapisan epitel yang berfungsi untuk mencegah masuknya benda asing. Pada UC lapisan epitel dari usus besar mengalami kerusakan sehingga terjadi peningkatan permeabilitas mukosa kolon yang menyebabkan zat-zat asing dapat masuk dengan mudah ke mukosa kolon. Akibatnya adalah terjadinya proses inflamasi dengan aktivasi makrofag sehingga terjadi peningkatan sekresi dari sitokin proinflamasi (Zhang, 2014).

Selama berlangsungnya proses inflamasi di kolon, *antigen presenting cell* (APC) seperti makrofag dan sel dendritik akan menyebabkan sel limfosit T CD4 teraktivasi dan berdiferensiasi menjadi sel Th1 dan sel Th2. Sel Th1 berperan dalam keadaan CD dan sel Th2 berperan dalam keadaan UC. Sitokin pro-inflamasi yang berperan didalam UC seperti TNF- α , IL-1, IL-4, IL-6, IL-5, IL-13 dan IFN- γ . Sitokin-sitokin tersebut akan meningkat jumlahnya dalam keadaan UC (Eichele dan Kharbanda, 2017; Kim dan Cheon, 2017). Sedangkan sitokin anti-inflamasi yang berperan adalah IL-10, IL-35 dan TGF- β (Guan dan Zhang, 2017; Das, 2016).

Pada kondisi UC sitokin dari sel Th2 seperti IL-13 dan IL-5 diproduksi untuk menginduksi terjadinya disfungsi epitel sawar. Hal tersebut membuat permeabilitas usus meningkat sehingga antigen dapat masuk. Sedangkan IL-5 berkontribusi dalam terjadinya rekrutmen dan aktivasi dari eosinofil (Danese dan Fiocchi, 2011; Zhang, 2014).

2.1.5 Gejala dan Diagnosis

Pada pasien UC akan muncul berbagai macam gejala, antara lain : (Conrad dan Laass, 2014).

- Diare berdarah dengan atau tanpa adanya mukus
- Nyeri perut
- Tenesmus
- Berat badan turun
- Demam
- Malaise

Beberapa hal yang harus dipastikan untuk menegakkan diagnosis IBD antara lain riwayat penyakit dan riwayat keluarga, pemeriksaan fisik, tes laboratorium, dan endoskopi dari usus besar.

a) Riwayat penyakit dan riwayat keluarga

Riwayat penyakit dan keluarga dapat digali dengan anamnesis yang baik untuk mendiagnosa yang benar terkait dengan riwayat kesehatan pasien dan juga keluarganya. (Lin *et al.*, 2011; Moller *et al.*, 2015). Anamnesis harus mencakup gejala klinis IBD dan riwayat keluarga yang pernah menderita akan meningkatkan 10-15 kali lipat risiko terkena IBD. Secara klinis UC dimanifestasikan dengan diare berdarah dan nyeri perut (Conrad *et al.*, 2014).

b) Pemeriksaan Fisik

Menurut Collins dan Rodhe, pemeriksaan fisik yang dilakukan pada pasien IBD adalah:

- Distensi abdomen atau pembengkakan
- Penekanan pada abdomen untuk mengecek kekakuan maupun nyeri pada perut.

c) Tes laboratorium

Tes laboratorium yang sering digunakan adalah pemeriksaan darah lengkap, *C-reactive protein* (CRP), laju endap darah (LED), *fecal lactoferrin* dan *fecal calprotectin*. Marker lain yang sering digunakan adalah *platelet*, perhitungan leukosit, dan serum albumin (Cioffi, 2015 dan Gajendran *et al.*, 2019).

- Tes Serologi

Penanda antibodi yang sering digunakan adalah perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) dan anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA). Penanda tersebut digunakan untuk membedakan UC dan CD. Pada CD, penanda serologinya adalah ASCA +/p-ANCA-, sedangkan UC, penanda serologinya adalah ASCA-/p-ANCA+.

- Pemeriksaan Feses

Fecal calprotectin dan *fecal lactoferrin* digunakan untuk melihat seberapa parah inflamasinya dan mendeteksi kekambuhan pasien UC. *Fecal calprotectin* dan *fecal lactoferrin* akan meningkat jumlahnya pada keadaan inflamasi mukosa usus.

Terkait dengan pemeriksaan fisik dan laboratorium, baik pasien maupun pada hewan coba mencit dengan UC biasanya memiliki gejala seperti penurunan berat badan, diare, *hematochezia*, dan perpanjangan dari kolon. Tingkat keparahan dan inflamasi dari UC salah satunya diukur melalui gejala-gejala tersebut. Untuk mengetahui derajat keparahan UC sendiri, maka digunakanlah skor *Disease Activity Index* (DAI) (Park *et al.*, 2015).

Tabel 2.1 Clinical Colitis Score

Symptoms/score	Characteristics
Body Weight Loss	
0	No weight loss
1	1 – 5 % loss of body weight
2	5 – 10 % loss of body weight
3	10 – 20 % loss of body weight
4	>20% loss of body weight
Stool consistency	
0	Normal feces
1	Loose stool
2	Watery diarrhea
3	Slimy diarrhea, little blood
4	Severe watery diarrhea with blood
Bleeding	
0	No blood
2	Presence of blood assessed by ColoScreen
4	III test Visible bleeding

(Park *et al.*, 2015)

Dari keterangan tabel 2.1 diatas, cara perhitungannya adalah ketiga skor tersebut dijumlah semua kemudian dibagi 3, hasilnya adalah berkisaran 0 (*healthy*) – 4 (aktivitas maksimal dari kolitis) (Lagishetty *et al.*, 2010).

d) Endoskopi pada Usus Besar

Endoskopi merupakan pemeriksaan standar baku emas untuk diagnosis UC, yakni kolonoskopi dan sigmoidoskopi. Kolonoskopi dan sigmoidoskopi memiliki beberapa fungsi antara lain untuk menegakkan diagnosis, untuk menilai tingkat dan aktivitas penyakit, untuk menunjukkan jaringan yang mengalami iritasi dan pembengkakan, ulser dan pertumbuhan yang abnormal seperti polip. Temuan endoskopi pada UC adalah adanya eritema, hilangnya pola vaskular yang biasa terjadi karena edema, rapuhnya mukosa, dan perdarahan spontan hingga terjadinya erosi atau ulserasi (Rameshshanker dan Arebi, 2012).

2.1.6 Terapi *Ulcerative Colitis*

Tujuan utama dari pengobatan UC adalah menginduksi dan mempertahankan remisi, mencegah terjadinya komplikasi, dan meningkatkan kualitas hidup dari pasien. Beberapa golongan obat-obatan yang biasanya digunakan dalam pengobatan UC adalah sebagai berikut :

a) 5-Aminosalicylates (5-ASA)

5-Aminosalicylates merupakan terapi inisial yang digunakan untuk UC dan telah digunakan selama lebih dari 30 tahun. 5-ASA dapat digunakan secara oral maupun secara topikal dalam bentuk *suppositories* atau *enemas*. Jika UC hanya terjadi pada bagian sisi kiri kolon maka sebaiknya pengobatan dengan cara topikal yaitu *enemas* ataupun *suppositories* lebih dianjurkan dikarenakan lebih efektif dan bisa menginduksi perbaikan kondisi hingga 90%. Tetapi, kebanyakan pasien lebih memilih menggunakan secara oral daripada topikal. Gejala biasanya akan membaik setelah pemberian obat 2 hingga 4 minggu (Fuerstein dan Cheifetz, 2014).

b) Kortikosteroid

Steroid sangat efektif dalam menginduksi kondisi perbaikan tubuh tetapi tidak bisa untuk mempertahankan kondisi perbaikan tubuh tersebut. Obat-obatan steroid yang biasanya digunakan adalah Prednison. Jika gejala yang ada gagal dalam merespon obat steroid oral maka disarankan untuk menggunakan obat anti-TNF atau steroid secara IV. Steroid secara IV efektif untuk menginduksi kondisi perbaikan tubuh hingga 70%, tetapi steroid tidak bisa untuk mempertahankan kondisi perbaikan tubuh sehingga pasien yang mengonsumsi

obat steroid harus dikombinasikan dengan obat –obatan yang dapat mempertahankan kondisi perbaikan tubuh tersebut (Fuerstein dan Cheifetz, 2014).

c) *Thiopurine*

Thiopurine merupakan obat yang dapat mempertahankan kondisi perbaikan tubuh dan biasanya obat ini digunakan kombinasi bersama dengan obat steroid dikarenakan obat steroid hanya bisa menginduksi kondisi perbaikan tubuh tetapi tidak bisa untuk mempertahankan kondisi perbaikan tubuh tersebut. Sebelum pasien diberikan obat *Thiopurine* sebaiknya pastikan bahwa aktivitas dari enzim *thiopurine metiltransferase* pada pasien berfungsi dengan baik untuk mengetahui metabolisme dari obat (Neurath, 2010).

Obat *Thiopurine* yang biasanya digunakan adalah *Mercaptopurine* dengan dosis 1 – 1.5 mg/kg dan *Azathiopurine* dengan dosis 2 – 2.5 mg/kg. Jika aktivitas enzim *thiopurine metiltransferase* pada pasien kurang baik maka dosis yang digunakan harus lebih rendah dari dosis seharusnya 25% - 50% untuk menghindari toksisitas (Neurath, 2010).

d) Anti-TNF

Obat-obatan *anti-TNF* bisa bekerja sendiri secara efektif maupun dikombinasi dengan *thiopurine* untuk menginduksi dan mempertahankan perbaikan kondisi. Beberapa obat-obatan anti-TNF yang digunakan untuk kolitis sedang-berat antara lain, *infliximab*, *adalimumab*, dan *golimumab*. *Infliximab* digunakan secara intravena sedangkan untuk *Adalimumab* dan *Golimumab* keduanya digunakan secara injeksi subkutan. Efek dari obat-obatan tersebut akan muncul setelah diminum dalam hitungan hari. Jika selama pengobatan *anti-TNF* gejala kembali terbentuk maka dapat dilakukan pengecekan pada konsentrasi dan antibodi pada obat tersebut. Kombinasi antara *anti-TNF* dengan

Thiopurine diketahui efektif untuk pengobatan Kolitis. *Thiopurine* efektif dalam meningkatkan level dari obat *anti-TNF* dan menurunkan risiko terjadinya perkembangan antibodi. Diketahui pula bahwa kombinasi *Thiopurine* dan *anti-TNF* dapat meningkatkan remisi dan *healing* mukosa (Fuerstein dan Cheifetz, 2014).

e) Operasi

Tindakan operasi dapat dilakukan jika pasien telah mengalami kondisi megakolon toksik, perforasi, perdarahan yang tidak terkontrol, kegagalan terapi (mengalami ketergantungan steroid), dan displasia kolon atau kanker (Larson dan Pemberton, 2004). Beberapa teknik operasi yang biasa dilakukan yaitu *total colectomy*, *total proctocolonectomy* dengan *end-ileostomy* atau *ileal pouch anal anastomosis*. Hampir 50% pasien yang telah menjalani operasi akan mengalami *pouchitis* dan sekitar 10-15% akan menjadi *pouchitis* kronik (Hwang dan Varma, 2008).

2.2 Trombosit

2.2.1 Morfologi Trombosit

Trombosit atau *platelet* merupakan partikel terkecil dari sel darah jika dilihat dari morfologinya, berjumlah 150 hingga $400 \times 10^9/L$ pada individu yang sehat. Trombosit memiliki diameter 2 hingga 5 μm , mempunyai ketebalan 0.5 μm , dan memiliki rata-rata volume sel 6 hingga 10 fl. Trombosit diproduksi oleh sel progenitor yaitu megakariosit di sumsum tulang, dan bisa beredar di sirkulasi darah selama 5 – 7 hari. Bentuknya yang kecil membuat trombosit mudah untuk masuk ke pembuluh darah, dan menempatkan diri di lokasi yang paling optimum (Krishnegowda dan Rajashekaraiah, 2015). Terkait siklus hidup trombosit,

trombosit mengalami penurunan ukuran, yakni trombosit *immature* ukurannya lebih besar daripada trombosit *mature*. Pada akhir masa hidupnya baik di pembuluh darah maupun setelah teraktivasi, trombosit akan membentuk gumpalan atau *clot* didalam pembuluh darah, dan akan di hancurkan dari pembuluh darah oleh neutrofil dan makrofag yang kemudian akan ditransportasikan menuju limpa untuk dibuang dari tubuh (Holinstat, 2017).

2.2.2 Fungsi Trombosit

Trombosit sangat erat kaitannya dengan hemostasis, yang akan menginisiasi terjadinya suatu penggumpalan darah. Trombosit hanya akan teraktivasi ketika pembuluh darah mengalami kerusakan. Tetapi hemostasis ataupun penggumpalan darah bukan merupakan fungsi satu-satunya dari trombosit. Fungsi lainnya dari trombosit adalah sebagai pemilik peran penting dalam peradangan dan pembentukan plak-plak atheroma (aterogenesis), pertahanan antimikroba pejamu, pertumbuhan tumor dan metastasis (Gremmel *et al.*, 2016). Kepekaan yang tinggi dari trombosit terhadap berbagai penyakit akhirnya menetapkan menjadi salah satu penanda yang paling mudah untuk dinilai, salah satunya adalah sebagai tolak ukur untuk penyakit kolitis (Yan *et al.*, 2013).

2.2.3 Kelainan Trombosit

Disamping berbicara mengenai normalnya trombosit, trombosit juga memiliki suatu kelainan yang meliputi, ketidaknormalan dalam jumlah trombosit yaitu trombosit yang jumlahnya terlalu tinggi (trombositosis), atau trombosit yang jumlahnya terlalu sedikit di darah (trombositopenia), dan disfungsi dari trombosit. Trombositosis merupakan produksi yang berlebihan dari trombosit yang bisa terjadi karena suatu kondisi klinis akut maupun kronis, seperti misalnya infeksi

akut, penyakit inflamasi kronis, defisiensi zat besi, dan kanker. Trombositosis memiliki dua jenis yaitu trombositosis reaktif dan trombositosis esensial. Trombositosis reaktif adalah suatu proses trombopoiesis yang meningkat secara sekunder yang disebabkan oleh suatu keadaan akut seperti inflamasi akut, dan keadaan kronis seperti defisiensi zat besi, anemia hemolitik, penyakit radang kronis ataupun infeksi (El-Moneim *et al.*, 2007). Dikatakan trombositosis pada manusia apabila ditemukan jumlah trombosit melebihi dari batas normalnya ($>400 \times 10^9/L$). Pada keadaan kolitis nilai trombosit mengalami peningkatan sehingga terjadilah suatu keadaan yang disebut dengan trombositosis. Trombositosis pada keadaan kolitis ditemukan adanya trombosit *immature* dalam darah, yang menunjukkan bahwa respon terhadap kolitis ini terkait dengan adanya *thrombopoiesis* yang mengalami percepatan. Selain *thrombopoiesis* yang mengalami percepatan, salah satu faktor lain terjadinya trombositosis adalah adanya kadar agregat *platelet-leukosit* (PLA) yang meningkat pada pasien kolitis (Yan *et al.*, 2013). Selain itu, trombositosis yang terjadi pada keadaan UC memiliki korelasi dengan mencit UC yang mengalami anemia defisiensi besi. Kekurangan zat besi didalam tubuh akan memicu peningkatan sel progenitor megakariosit untuk memproduksi trombosit lebih banyak lagi. Karena proses produksi trombosit yang harus segera meningkat maka trombosit yang dikeluarkan oleh megakariosit banyak yang *immature* (Vandoukis *et al.*, 2013). Trombositosis yang disertai dengan adanya trombosit *immature* dalam darah, menunjukkan bahwa respon terhadap UC terkait dengan trombopoiesis yang dipercepat. Karena trombosit *immature* diketahui hiper-reaktif terhadap stimulasi agonis, sehingga pada pasien IBD sering terjadi pembentukan trombus. Trombus tersebut dapat menyebar secara ekstra intestinal melalui sirkulasi arteri dan vena

dan biasanya dimanifestasikan sebagai *deep vein thrombosis* (DVT) atau sebagai emboli paru (Yan SL *et al.*, 2013). Trombosis yang diakibatkan oleh pembentukan trombus tersebut dikaitkan dengan angka kematian yang tinggi (Andrade *et al.*, 2018).

Trombositopenia merupakan keadaan dimana salah satunya adalah kegagalan produksi dari trombosit, meningkatnya sekuestrasi dari trombosit di limpa, dilusi dari trombosit, dan atau kombinasi dari ketiga mekanisme tersebut. Dapat dikatakan keadaan tersebut merupakan trombositopenia apabila jumlah trombosit berada di bawah jumlah normal yaitu $<150 \times 10^9/L$ (Krishnegowda dan Rajashekaraiah, 2015).

Pada hewan coba jenis mencit dengan *strain* BALB/c dikatakan memiliki nilai *platelet* normal yakni sebesar 515 hingga $1150 \times 10^3/mm^3$ (Barrios *et al.*, 2009).

2.2.4 Thrombopoiesis

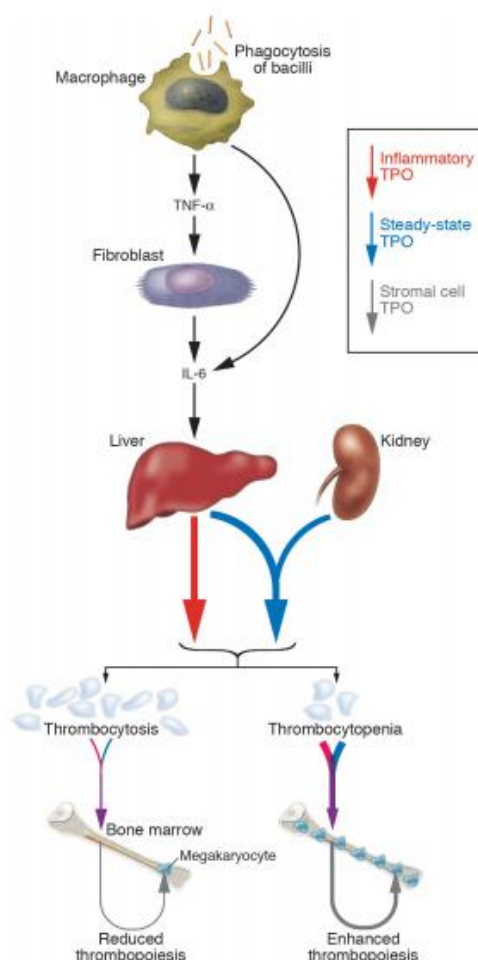
Thrombopoietin (TPO) merupakan suatu sitokin yang meregulasi proliferasi dan diferensiasi dari megakariosit. *Thrombopoietin* memiliki reseptor yaitu c-mpl, yang diekspresikan oleh sumsum tulang/sel progenitor *hematopoetic* pada manusia dewasa (Ninos *et al.*, 2006). Para peneliti telah menemukan bahwa kadar trombopoetin yang berada di darah dan sumsum tulang berbanding terbalik dengan jumlah trombosit. Pasien dengan anemia aplastik atau trombositopenia akibat terapi mielosupresif menunjukkan kadar hormon yang tinggi. Namun, ada beberapa pengecualian dari pernyataan tersebut. Yang pertama terlihat pada keadaan *platelet destructions*, di mana kadar hormonnya tidak setinggi yang akan diantisipasi dari tingkat trombositopenia. Contoh tersebut, terlihat pada sebagian besar pasien dengan trombositopenia purpura

idiopatik (ITP), ditandai dengan hipertrofi megakariosit, yang kemungkinan berkontribusi pada regulasi dari trombopoietin. Contoh kedua adalah di mana kadar trombopoietin tidak diprediksi secara akurat oleh jumlah trombosit darah, yaitu pada pasien dengan inflamasi dan trombositosis reaktif, di mana kadar hormon lebih tinggi dari yang diharapkan (Kaushansky, 2005).

Komponen utama dari regulasi trombopoietin diterima oleh adanya *receptor-mediated uptake and destruction*. Trombosit mengandung reseptor trombopoietin berafinitas tinggi. Ketika jumlah trombosit di darah naik atau trombositosis, maka reseptor tersebut akan mengurangi jumlah hormon di sirkulasi, menekan jumlah hormon tersebut, sedangkan pada keadaan trombositopenia kadar trombosit di darah sedikit sehingga memungkinkan naiknya kadar reseptor dan mendorong peningkatan trombopoiesis (Kaushansky, 2005).

Trombositosis dapat terjadi melalui beberapa mekanisme, yaitu salah satu diantaranya adalah melalui jalur mediator inflamasi dan melalui jalur *P-selectin*. *P-selectin* diekspresikan oleh sel megakariosit dan sel endotel pada pembuluh darah. Pengeluaran *p-selectin* terjadi melalui dua cara, yaitu disintesis langsung oleh megakariosit dan sel endotel pembuluh darah dan cara kedua adalah dengan mediator inflamasi yang mengalami peningkatan, salah satunya adalah sitokin TNF- α dan IL-4. Selain itu, mekanisme trombositosis pada penyakit kolitis dikarenakan peningkatan dari sitokin pro inflamasi yaitu IL-6. Saat terjadi kolitis maka di usus sedang terjadi proses ketidakseimbangan sistem imun yakni sitokin pro inflamasi lebih banyak jumlahnya daripada sitokin anti inflamasi. Salah satu sitokin proinflamasi adalah IL-6, dan saat IL-6 mengalami peningkatan maka hormon trombopoietin yang diproduksi oleh hepar akan

teraktivasi. Trombopoietin adalah hormon yang berfungsi untuk merangsang sel progenitor dari trombosit yaitu megakariosit untuk menghasilkan sel trombosit yang lebih banyak lagi, sehingga pada penyakit kolitis terjadilah suatu keadaan yang disebut dengan trombositosis (Vandoukis *et al.*, 2013).



Gambar 2.1 Regulasi hormon trombopoiesis (Kaushansky, 2005)

Keterangan: Gambar 2.1 menjelaskan tentang regulasi dari trombopoietin oleh reseptor *c-mpl*, hormon trombopoietin tersebut dikeluarkan dari sirkulasi dan dihancurkan, yang mana keadaan tersebut akan membuat *platelet* didarah berkurang. Saat terjadi suatu peradangan, IL-6 dikeluarkan oleh makrofag melalui stimulasi dari TNF-α, dan akan dibawa ke liver melalui sirkulasi untuk meningkatkan kadar dari produksi trombopoietin sehingga munculah keadaan trombositosis. Sedangkan pada keadaan trombositopenia, juga terjadi peningkatan produksi dari trombopoietin.

2.3 Dextran Sulphate Sodium (DSS)

Dextran Sulphate Sodium (DSS) merupakan polisakarida sulfat yang larut dalam air dan bermuatan negatif dengan berat molekul sangat bervariasi yaitu mulai dari 5 hingga 1400 kDa. *Dextran Sulphate Sodium* dalam menginduksi mencit menjadi kolitis tidak secara langsung menginduksi peradangan usus, tetapi bertindak sebagai racun kimia yang langsung menyerang ke epitel kolon dan menyebabkan kerusakan mukosa kolon sehingga antigen dapat masuk kedalam mukosa dan memungkinkan terjadinya penyebaran kedalam jaringan dibawahnya (Chassaing *et al.*, 2014).

Efektivitas radang usus yang diinduksi DSS tergantung pada beberapa faktor, termasuk konsentrasi DSS (biasanya 2% - 5%) durasi dan frekuensi pemberian (akut atau kronis), berat molekul DSS buatan, strain hewan yang digunakan, dan lingkungan mikroba hewan (yaitu bebas kuman dibandingkan patogen bebas spesifik). Terkait dengan berat molekul DSS yang digunakan biasanya adalah 40-50 kDa untuk terjadinya penetrasi ke mukosa kolon, untuk dosis yang digunakan biasanya adalah kisaran 2% - 5% dan untuk durasinya jika ingin mendapatkan fase akut maka 7 hari. Pada beberapa jenis *strain*, ada *strain* tertentu yang lebih rentan terhadap kolitis DSS daripada jenis *strain* lainnya, dan *strain* yang rentan tersebut misalnya seperti BALB/C, C3H, dan lain-lain (Eichele dan Kharbanda, 2017; Chassaing *et al.*, 2014)).

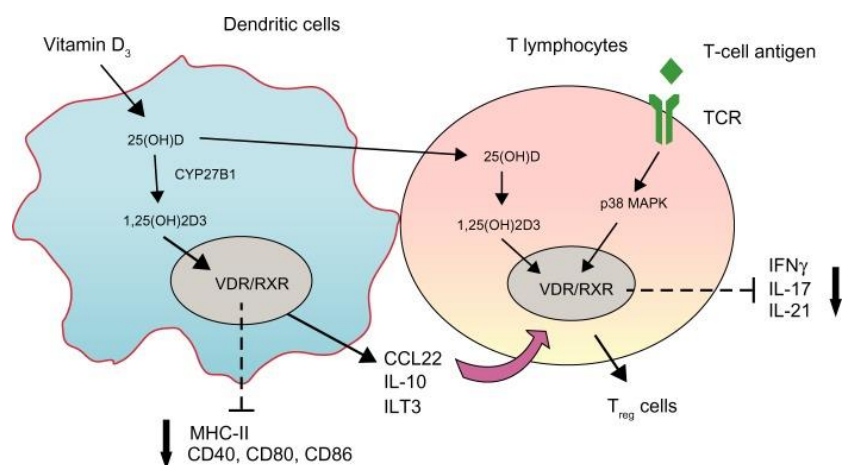
2.4 Vitamin D

Vitamin D merupakan vitamin yang larut lemak yang memiliki bentuk aktif *calcitriol* atau 1,25-*dihydroxyvitamin* D3 (1,25 (OH) 2D3) yang berfungsi untuk regulasi metabolisme tulang, kalsium, dan fosfor. Vitamin D juga mempengaruhi fungsi sistem kekebalan tubuh, dan kekurangan vitamin D ditubuh telah diakui

sebagai faktor risiko lingkungan untuk penyakit autoimun seperti IBD (Ardesia *et al.*, 2015).

Vitamin D memiliki dua bentuk utama, yaitu vitamin D₂ dan vitamin D₃. Vitamin D₃ (*cholecalciferol*) bisa didapatkan dari makanan atau bisa disintesis di kulit dalam bentuk *7-dehydrocholesterol* dengan bantuan sinar ultraviolet. Vitamin D dalam menjalankan fungsinya harus diubah menjadi bentuk aktif yaitu 1,25 (OH)₂D₃. Vitamin D didalam peredaran darah dibawah oleh protein spesifik pengikat vitamin D yaitu *Vitamin D Binding Protein (VDBP)* untuk dibawa ke hepar. Didalam hepar vitamin D dihidroksilasi menjadi *25-hydroxyvitamin*. Kemudian, *25-hydroxyvitamin* dibawa lagi oleh VDBP menuju ke ginjal. Di Ginjal, tepatnya pada Tubulus Proximal Ginjal *25-hydroxyvitamin* dihidroksilasi kembali menjadi bentuk aktif dari vitamin D yaitu *1,25-dihydroxyvitamin D₃* (1,25 (OH)₂D₃) (Christakos *et al.*, 2010).

Vitamin D memiliki berbagai macam fungsi yaitu antara lain sebagai anti inflamasi, anti apoptosis dan anti fibrosis. Vitamin D sebagai anti inflamasi memainkan peran penting dalam modulasi sistem kekebalan/peradangan melalui pengaturan produksi sitokin inflamasi dan menghambat proliferasi sel-sel proinflamasi. Vitamin D memiliki peran dalam sistem imun alami maupun adaptif (Yin dan Agrawal, 2014). Peran dalam sistem imun alami yaitu regulasi dari makrofag dan sel dendritik, sedangkan dalam sistem imun adaptif yaitu dengan mengubah aksi dari aktivasi sel T dan sel B. Bentuk aktif vitamin D bekerja dengan menekan proliferasi dan menurunkan regulasi dari sitokin proinflamasi seperti *C reactive protein (CRP)*, *tumour necrosis alpha (TNF α)*, interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 (IL-1) dan interleukin 8 serta dapat meningkatkan regulasi sitokin anti inflamasi seperti interleukin 10 (IL-10) dan TGF-β (Reich *et al.*, 2014).



Gambar 2.2 Mekanisme Vitamin D sebagai anti inflamasi (Yin, 2014)

Keterangan: Gambar 2.2 menunjukkan bahwa prekursor vitamin D kemudian diubah menjadi bentuk aktif menjadi $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ baik pada sel dendritik maupun sel limfosit T. Setelah itu, masing-masing vitamin D yang sudah menjadi bentuk aktif tersebut berikatan dengan reseptornya yaitu *Vitamin D receptor-retinoid X receptor* (VDR/RXR) di dalam masing-masing nukleus sel T dan sel dendritik. Didalam sel dendritik, setelah berikatan dengan VDR/RXR maka akan memicu terjadinya penurunan ekspresi dari *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas II, *Cluster of Differentiation* 40 (CD 40), CD80, CD86, dan peningkatan ekspresi dari *Immunoglobulin-like Transcript* (ILT)-3, serta peningkatan sekresi interleukin (IL)-10 dan *CC motif ligand* 22 (CCL22), yang akan menghasilkan terjadinya induksi dari sel T-regulator. Sedangkan didalam sel limfosit T, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ akan terekspresi jika terdapat sinyal dari *T-cell antigen receptor* (TCR). Ekspresi dari VDR diinduksi oleh sinyal dari TCR melalui jalur alternatif yaitu *p38 mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Sehingga, apabila $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ telah berikatan dengan VDR maka akan terjadi inhibisi dari pengekspresian sitokin pro inflamasi termasuk adalah interferon (IFN)- γ , IL-17, and IL-21, dan akan menginduksi terjadi perkembangan dari sel T regulator.

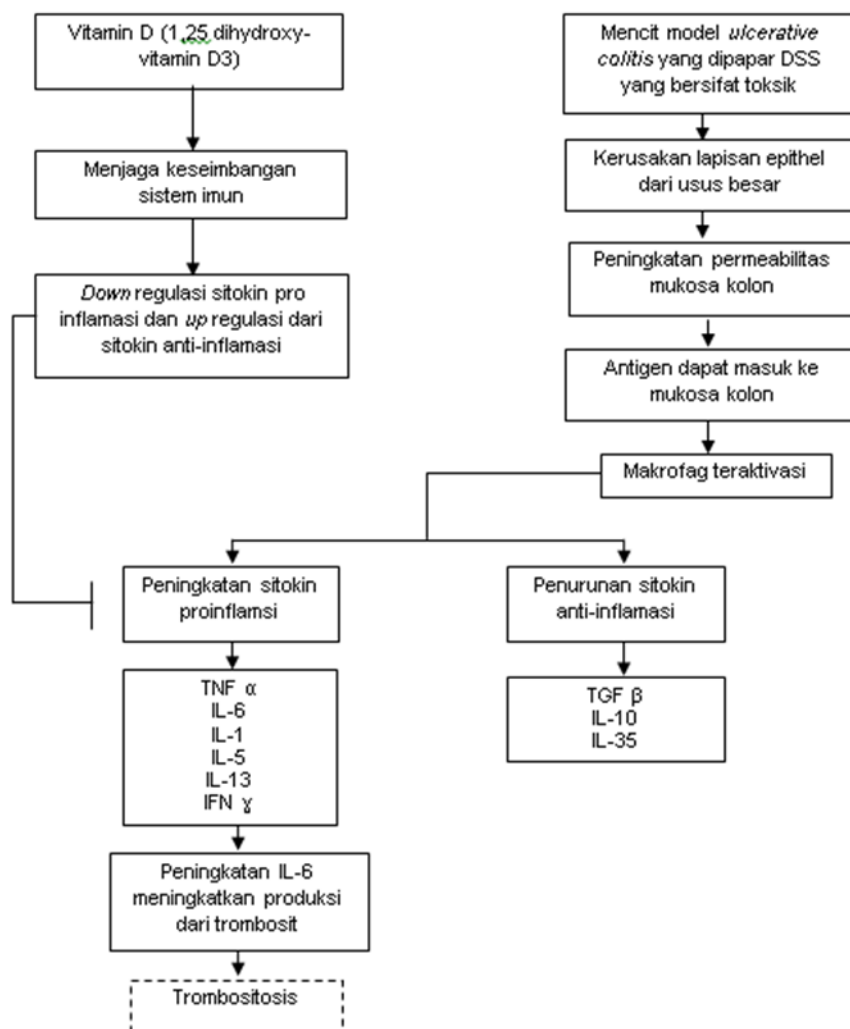
Pada beberapa penelitian sebelumnya, menunjukkan bahwa vitamin D tidak hanya berperan sebagai anti-inflamasi tetapi juga mampu untuk mengembalikan kerusakan dari mukosa sawar usus. Mekanisme tersebut dilakukan oleh vitamin D dengan mempromosikan ekspresi protein yang berfungsi sebagai *tight junction* di usus yaitu protein zonula occludens-1 (ZO-1), claudin-1,

dan occludin. Dengan mempromosikan ekspresi dari *tight junction* tersebut, maka protein-protein tersebut akan mengalami peningkatan dalam jumlah didalam darah untuk membantu meningkatkan ikatan antar tight junction dengan sel epitel intestinal yang mana akan membuat pertahanan *tight junction* di intestinal menjadi semakin kuat dan berfungsi sesuai dengan fungsinya (Li *et al.*, 2018)

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

Keterangan :



3.2 Uraian Kerangka Konsep

Mencit model UC didapatkan dari mencit yang diinduksi oleh *Dextran Sulphate Sodium* (DSS). DSS memiliki sifat toksik sehingga menyebabkan terjadinya kerusakan pada lapisan epitel dari usus besar. Jika lapisan epitel usus besar mengalami kerusakan maka akan terjadi peningkatan permeabilitas pada mukosa usus besar dan membuat antigen-antigen asing dapat masuk ke mukosa usus besar dan menyerang usus besar. Dalam hal ini, antigen yang dapat masuk adalah molekul dari DSS. Jika antigen telah masuk kedalam mukosa usus besar maka akan terjadi aktivasi dari makrofag. Aktivasi dari makrofag tersebut merupakan respon imun alami yang akan meningkatkan diferensiasi dan proliferasi dari sel T.

Pada keadaan UC, terjadi ketidakseimbangan antara respon imunogenik dan toleransi, sehingga terjadi aktivasi yang berlebihan dari respon inflamasi. Aktivasi dari respon inflamasi yang berlebihan tersebut diakibatkan karena ketidakseimbangan dari sitokin pro inflamasi dan anti inflamasi. Sitokin pro-inflamasi yang berperan didalam UC seperti TNF- α , IL-1, IL-4, IL-6, IL-5, IL-13 dan IFN- γ . Sitokin-sitokin tersebut akan meningkat jumlahnya dalam keadaan UC. Sedangkan sitokin anti-inflamasi yang berperan adalah IL-10, IL-35 dan TGF- β . Salah satu sitokin pro inflamasi yang berperan dalam terjadinya UC adalah IL-6. IL-6 merupakan sitokin pro inflamasi yang berhubungan dengan terjadinya trombositosis. Saat IL-6 mengalami peningkatan, maka akan terjadi aktivasi dari hormon

trombopoetin di hepar untuk merangsang sumsum tulang mengeluarkan trombosit, sehingga terjadilah pengeluaran trombosit secara berlebihan di darah dan terjadilah trombositosis pada UC.

Vitamin D memiliki efek pleotropik yaitu antara lain berupa anti inflamasi, anti apoptosis dan anti fibrosis. Vitamin D dapat berperan dalam sistem imun alami maupun adaptif. Bentuk aktif dari vitamin D yakni $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dapat menginduksi diferensiasi monosit menjadi makrofag, menghambat ekspresi molekul MHC kelas II dan meregulasi sitokin-sitokin inflamasi. Vitamin D sebagai anti inflamasi bekerja dengan menekan jumlah sitokin proinflamasi dan meningkatkan jumlah sitokin anti-inflamasi, yakni termasuk penekanan sitokin pro-inflamasi dari IL-6. Jika jumlah IL-6 di darah jumlahnya berkurang, maka regulasi terhadap hormon trombopoetin juga berkurang dan juga akan membuat megakariosit yang berfungsi sebagai progenitor dari trombosit tidak hiperaktif untuk mengeluarkan trombosit, sehingga menyebabkan trombosit di darah jumlahnya menjadi normal kembali dan tidak mengalami trombositosis.

Berdasarkan mekanisme tersebut, diharapkan pemberian vitamin D dapat menurunkan produksi sitokin-sitokin proinflamasi, meningkatkan regulasi sitokin anti inflamasi, sehingga respon inflamasi yang berlebihan dan manifestasi seperti trombositosis dapat dihentikan.

3.3 Hipotesis Penelitian

Terdapat penurunan jumlah kadar trombosit dalam darah pada mencit model *ulcerative colitis* yang diinduksi DSS dengan pemberian vitamin D.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental (*true experimental design*) dengan menggunakan rancangan *randomized post test only control group design*.

4.2 Sampel Penelitian

4.2.1 Pemilihan Sampel

Sampel penelitian adalah model mencit BALB/c. Pemilihan sampel penelitian untuk pengelompokan perlakuan menggunakan secara acak. Hewan coba, bahan pakan, dan bahan penelitian lainnya homogen. Mencit diperoleh dan dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Kriteria inklusi untuk dijadikan sampel adalah sebagai berikut :

- a) Mencit BALB/c jantan
- b) Umur 6-8 minggu
- c) Berat badan 17-21 gram
- d) Kondisi sehat, aktif dan tidak ada kelainan anatomi

Kriteria Eksklusi adalah sebagai berikut :

- a) Mencit BALB/c jantan yang tidak mau makan seterusnya selama masa penelitian.

- b) Mencit BALB/c jantan yang tidak bergerak aktif atau sakit selama masa perlakuan
- c) Mencit BALB/c jantan yang mati selama masa perlakuan.

4.2.2 Besar Sampel

Perhitungan pengulangan sampel adalah sebagai berikut :

$$p(n-1) \geq 15$$

p : jumlah perlakuan, n : jumlah pengulangan

pada penelitian ini p = 3 sehingga jumlah pengulangan adalah :

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n - 4 \geq 15$$

$$n \geq 6$$

Untuk setiap perlakuan dilakukan 6 kali pengulangan sehingga total sampel yang dibutuhkan adalah 18 ekor mencit.

Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan

Kelompok	N	Induksi dan Perlakuan
Kontrol Negatif	7	Mencit normal tidak diterapi vitamin D dosis 0.2 µg /25 gBB/hari
Kontrol Positif (DSS)	7	Mencit model <i>ulcerative colitis</i> dengan induksi DSS 3% tanpa terapi
Perlakuan (DSS+ Vitamin D)	7	Mencit model <i>ulcerative colitis</i> dengan induksi DSS 3% kemudian diterapi dengan

vitamin D dosis 0.2 µg /25
gBB/hari

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah Vitamin D.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah trombosit.

4.4 Waktu dan Tempat Penelitian

4.4.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam rentang waktu 2 bulan terhitung mulai dari Januari hingga akhir Februari 2018.

4.4.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yaitu di Laboratorium Farmakologi untuk perawatan mencit dan di Laboratorium Patologi Klinik untuk analisa jumlah trombosit.

4.5 Definisi Operasional

- a) *Dextran Sodium Sulphate* (DSS) 3% adalah serbuk DSS dengan merk abcam dosis 3 gram yang dicampurkan pada 100 ml air minum selama 7 hari diperoleh dari Laboratorium Farmakologi FKUB.
- b) Vitamin D adalah vitamin D bentuk aktif 1,25 (OH)₂D₃ diperoleh dari Laboratorium Farmakologi FKUB secara peroral dengan dosis 0.2 ug/25

gBB/hari dengan sediaan cair melalui sonde selama 7 hari (Zhao *et al.*, 2012).

- c) Jumlah trombosit adalah trombosit di darah yang diukur dengan alat *hematology analyzer* dengan satuan $10^3/\text{mm}^3$ yang diukur di Laboratorium Patologi Klinik dengan alat ABX Micro 60.
- d) Mencit model UC adalah mencit yang diinduksi dengan DSS 3% melalui air minum selama 7 hari.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Mencit

Alat dan bahan yang diperlukan adalah kandang dari kotak berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm berserta tutup kandang dari anyaman kawat, baskom plastik, timbangan, gelas ukur, botol air minum mencit, penimbangan berat badan dengan neraca digital.

4.6.2 Alat dan Bahan untuk Sonde Vitamin D

Alat dan bahan yang diperlukan yaitu Vitamin D, sonde, minyak jagung dan *handscoon*.

4.6.3 Alat dan Bahan untuk Induksi Ulcerative Colitis

Alat dan bahan yang diperlukan yaitu DSS 3 gram, air 100ml, dan botol air minum mencit.

4.6.4 Alat dan Bahan untuk Pengambilan Sampel Darah

Alat dan bahan yang diperlukan yaitu ketamin 0.1 mL/ekor, *sputit* 1cc untuk mengambil darah, tabung EDTA, *handscoon*, *masker*.

4.7 Prosedur Kerja Penelitian

4.7.1 Pengelolaan dan Pemeliharaan Mencit

- a) Mencit BALB/c jantan berasal dari Pusvetma Surabaya.
- b) Pada awal penelitian, semua mencit ditimbang berat badannya kemudian dilakukan randomisasi agar setiap mencit mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan.
- c) Mengadaptasi mencit BALB/c selama 7 hari di dalam masing-masing kandang dengan pemberian diet normal yaitu pakan standar *american institute of nutrition* (AIN). Pada masa adaptasi ini, berat mencit ditimbang setiap hari agar dapat dipantau bahwa berat badan mencit tidak mengalami penurunan dan berada dalam kondisi yang baik.
- d) Memberi label pada kandang mencit sesuai dengan perlakuan yaitu label kontrol, dan perlakuan induksi kolitis dengan DSS 3% dan pemberian vitamin D dengan dosis 0.2 ug/25 gBB/hari melalui sonde. Setiap kelompok berisi 7 mencit.
- e) Memberi alas pada kandang berupa sekam dengan ketebalan secukupnya dan melakukan pergantian sekam sebanyak 2 kali seminggu.
- f) Memberikan minum dengan air setiap hari yang ditempatkan pada botol minum ukuran 15-30 mL dan terdapat pipa dengan bola katup tempat keluarnya air minum. Tempat ini diletakkan di atas kawat penutup kandang.
- g) Memberikan pakan setiap hari yang berupa pakan standar AIN yang ditimbang sebanyak 20 gram untuk setiap mencit.

- h) Mengganti air minum mencit yang diberi perlakuan dengan air dicampur DSS 3% selama 7 hari.

4.7.2 Proses Induksi Vitamin D

- a) Berdasarkan dosis vitamin D pada mencit yaitu $0.2 \mu\text{g} / 25 \text{ gBB/hari}$ maka didapatkan dosis $0.16 \mu\text{g}$ untuk mencit dengan rata-rata berat badan 20g.
- b) Analog dari bentuk aktif vitamin D *1,25-dihydroxyvitamin D3* [$1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$] dengan sediaan cair diambil sebanyak 0.00128mL, kemudian dicampurkan dengan minyak jagung sebanyak 0.49872 mL.
- c) Hasil pencampuran tersebut diinduksikan dengan cara sonde setiap hari sekali selama 7 hari.
- (Zhao *et al.*, 2012).

4.7.3 Proses Induksi *Ulcerative Colitis*

- a) Yang diberikan induksi adalah kelompok mencit selain kontrol negatif yang telah diadaptasikan selama 7 hari. Untuk kelompok kontrol positif dan perlakuan , diberi DSS 3% setelah aklimatisasi.
- b) Memberikan DSS 3% dicampur dengan minum mencit selama 7 hari (Park *et al.*, 2015 ; Chassaing *et al.*, 2014).

4.7.4 Pengukuran Berat Badan dan Pengecekan Feses Mencit

Pengukuran berat badan dan feses untuk melihat klinis *ulcerative colitis* menurut skor *Disease Activity Index (DAI)*.

- a) Pengukuran berat badan dilakukan setiap hari mulai dari awal aklimatisasi sampai sebelum dibedah.

- b) Pengecekan feses mencit untuk melihat manifestasi klinis dari *ulcerative colitis* dan dilakukan setiap hari, kemudian dikonversi pada skor DAI.

4.7.5 Pengambilan Sampel Darah Mencit

- a) Sebelum dilakukan pembedahan, mencit di anastesi terlebih dahulu menggunakan ketamin 0.1 mL/ekor.
- b) Setelah pembedahan, siapkan *syringe* 1 cc lalu tusukkan *syringe* ke jantung mencit dan disedot secara perlahan.
- c) Darah yang telah diambil dimasukkan kedalam tabung EDTA.

4.7.6 Perlakuan Mencit Setelah Pengambilan Sampel

Setelah pengambilan sampel darah, tubuh mencit yang tidak diambil untuk sampel jaringan dikuburkan secara bersamaan di halaman belakang Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.8 Pemeriksaan Jumlah Trombosit

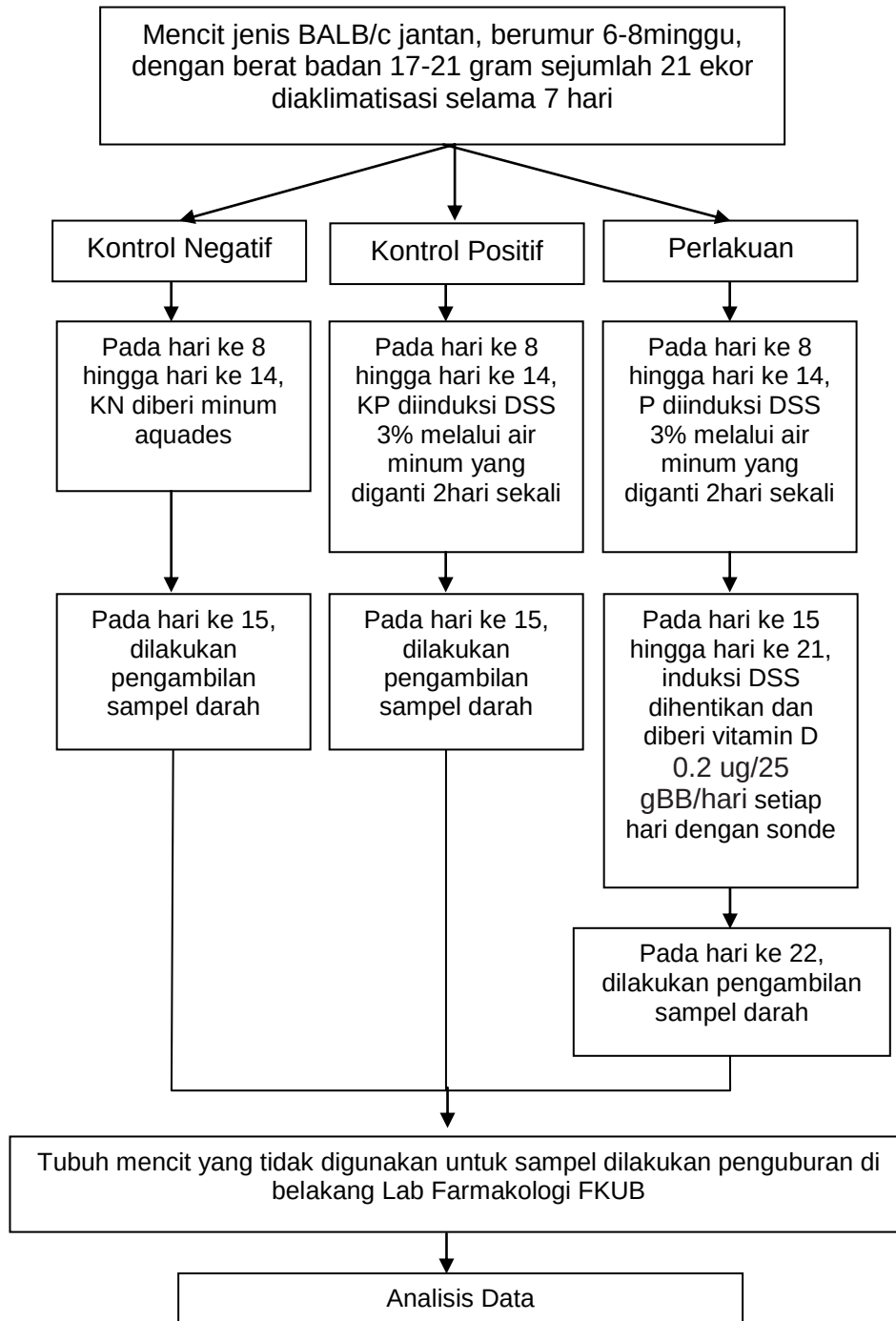
Pada pengecekan darah untuk darah lengkap khususnya trombosit digunakan alat ABX MICROS 60 yang merupakan alat *automatic*. Prinsip dari alat itu sendiri adalah berdasarkan spesifikasi ukuran sel yang melewati filter dengan memakai tegangan listrik untuk sekali pembacaan bisa diperiksa sekaligus beberapa parameter seperti Hemoglobin (Hb), Hematokrit (Ht), Leukosit, Trombosit, Eritrosit, *Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH)*, *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC)*, *Mean Corpuscular Volume (MCV)*, dan Hitung Jenis Leukosit (Chhabra, 2018).

Cara pemeriksaan kadar trombosit yaitu ketika sel-sel darah melewati *aperture* (diafragma), sel-sel darah menciptakan resistansi (*Impedence*) di medan elektronik antara dua elektroda. Karena arusnya konstan dan tetap tidak berubah, semakin besar selnya, semakin banyak "perlawanan" yang dimilikinya. Semakin kecil sel, semakin sedikit "resistensi" yang dimilikinya. Tegangan yang mengukur sel sebanding dengan ukuran sel. Semakin besar sel, semakin tinggi tegangannya. Semakin kecil sel, semakin rendah tegangannya. Tegangan elektronik ini bervariasi dalam ukuran pulsa saat sel melewati *aperture* (diafragma). *Pulse* kemudian disalurkan sesuai dengan ukuran *pulse*. *Pulse* kemudian diratakan, dikelompokkan, kemudian dihitung secara matematis untuk menciptakan nilai numerik untuk penentuan *red blood cell* (RBC) dan *platelet* (PLT). Sejumlah sel akan melewati *aperture* mikro kalibrasi dalam jangka waktu tertentu. Sel kemudian diukur dengan tinggi *pulse*, *thresholded*, dikelompokkan berdasarkan ukuran, dan dihitung secara matematis bersama dengan koefisien kalibrasi untuk memberikan nilai numerik akhir untuk RBC dan PLT (Horiba, 2019).

4.9 Analisis Data

Hasil pengukuran mencit kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik tingkat signifikansi 0.05 ($\alpha = 0.05$) atau taraf kepercayaan 95%. Langkah-langkah uji hipotesis komparatif adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *One-way ANOVA*, dan uji *Least Significant Difference* (LSD) (Dahlan, 2004).

4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Karakteristik Mencit *Ulcerative Colitis* (UC)

Dextran sulphate sodium diberikan pada mencit dengan pencampuran bersama air dan akan diminum oleh mencit melalui botol minum mencit dan diberikan selama dua hari sekali. Apabila mencit telah berhasil terinduksi menjadi mencit UC maka akan muncul tanda dan gejala yaitu berat badan mencit akan mengalami penurunan dan akibat dari rusaknya usus mencit akan membuat feses mencit menjadi merah akibat darah yang keluar bersama feses mencit. Derajat keparahan dari UC pada mencit diukur melalui skor *disease activity index* (DAI). Cara perhitungannya adalah ketiga skor dari tiap-tiap karakteristik/gejala dijumlahkan semua kemudian dibagi 3, hasilnya adalah berkisaran 0 (*healthy*) – 4 (aktivitas maksimal dari kolitis) (Lagishetty *et al.*, 2010). Pada awal penelitian sebelum dilakukan perlakuan, rata-rata berat badan mencit pada kelompok kontrol negatif yaitu tanpa diberikan DSS dan tanpa terapi vitamin D sebesar 25.57 gram, kelompok kontrol positif yaitu diberikan induksi DSS 3% dan tanpa terapi vitamin D sebesar 25.28 gram, dan kelompok perlakuan yaitu diberikan induksi DSS 3% dan diterapi dengan vitamin D dosis 0.2 µg /25 gBB/hari sebesar 20.57 gram. Untuk penilaian pada feses mencit, pada awal penelitian feses mencit masih dalam batasan normal yakni tidak ada perdarahan pada feses. Setelah diberikan perlakuan, rata-rata berat badan mencit pada kelompok kontrol negatif sebesar 27.28 gram yang berarti tidak

didapatkan adanya penurunan berat badan dan konsistensi feses masih dalam batas normal serta tidak didapatkan perdarahan pada feses. Jika dilihat melalui penilaian skor DAI, tidak didapatkan adanya penurunan berat badan yakni skor 0, konsistensi feses yang tetap normal yakni skor 0, dan tidak adanya perdarahan di feses yakni skor 0, sehingga jika skor diakumulasikan dan dibagi tiga sesuai perhitungan DAI maka kelompok kontrol negatif mendapatkan skor 0 yang berarti mencit kelompok kontrol negatif dalam kondisi sehat. Sedangkan untuk kelompok kontrol positif yang diinduksi dengan DSS 3% selama 7 hari memiliki rata-rata berat badan sebesar 25 gram yang berarti didapatkan adanya penurunan berat badan sebesar 1.12% yakni skor 1 dan untuk penilaian feses mendapatkan skor 1 yang berarti feses masuk dalam kategori *loose stool*, serta tidak didapatkan adanya perdarahan pada feses yakni skor 0, sehingga skor DAI untuk kelompok kontrol positif jika diakumulasikan $(1+1+0)$ dan dibagi tiga sebesar 0.667 yang berarti didapatkan adanya aktivitas colitis dalam batas minimal. Lalu, untuk kelompok perlakuan yang diinduksi dengan DSS 3% selama 7 hari dan diberikan terapi vitamin D dosis $0.2 \mu\text{g} / 25 \text{ gBB/hari}$ selama 7 hari mendapatkan skor 0 pada penilaian DAI yang berarti mencit dalam kondisi sehat yakni tidak didapatkan adanya penurunan berat badan (skor 0), konsistensi feses yang masih normal (skor 0), dan tidak didapatkan adanya perdarahan pada feses mencit (skor 0).

Selain menggunakan skor DAI, metode lain yang dapat digunakan untuk menentukan adanya aktivitas kolitis pada mencit yang diinduksi DSS adalah *mouse colitis histology index* (MCHI), yaitu scoring berdasarkan histologi kolon seperti adanya sel goblet yang menghilang, densitas kript, hiperplasia kript, dan infiltrasi

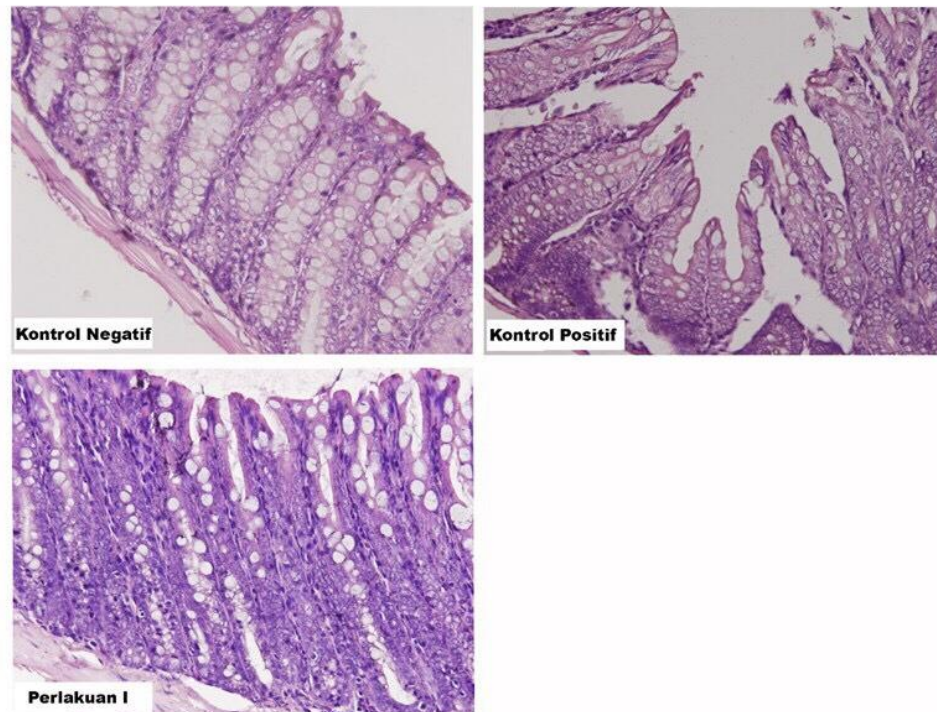
submukosa. Total skor dari MCHI antara 0 (tidak berpenyakit) – 22 (penyakit yang berat), dan dikatakan skor 8 - 13 merupakan skor yang menandakan adanya aktivitas kolitis. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan total skor 8 pada kelompok kontrol (+) yang berarti adanya aktivitas kolitis (Koelink *et al.*, 2018).

Tabel 5.1 Skor *Mouse Colitis Histology Index* (MCHI)

Jenis	Nilai	Faktor
Sel goblet menghilang	0 tidak ada	1
	1 <10%	
	2 10- 50%	
	3 >50%	
Densitas kript	0 Normal	2
	1 <10% penurunan densitas kript	
	2 ≥10% penurunan densitas kript	
Hiperplasia kript	0 tidak ada	2
	1 peningkatan sedikit Panjang kript	
	2 peningkatan Panjang kript sebanyak 2-3x	
	3 peningkatan Panjang kript >3x	
Infiltrasi submucosa	0 tidak ada	3
	1 infiltrasi sel tunggal	
	2 infiltrasi sel sedang	
	3 infiltrasi sel dalam jumlah besar	

(Koelink *et al.*, 2018)

Gambar 5.1 Histologi Kolon Mencit Masing-Masing Perlakuan

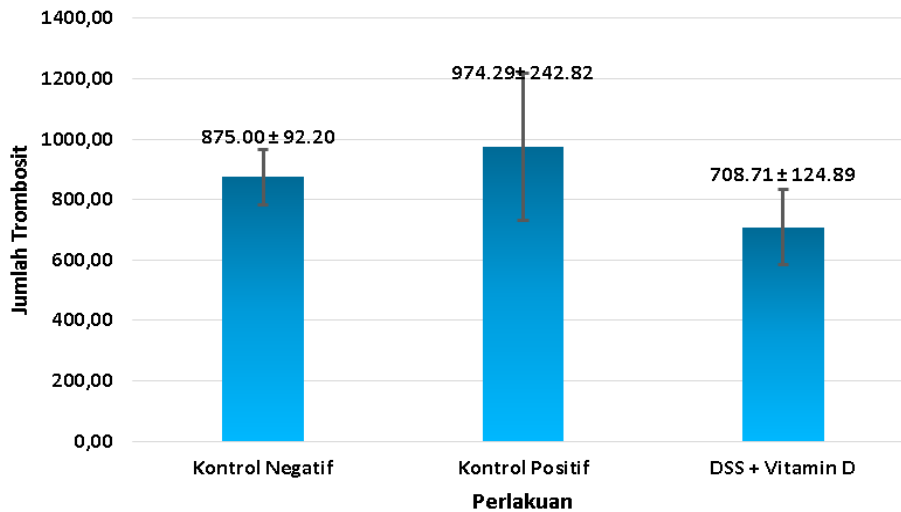


5.1.2 Pengaruh Pemberian Vitamin D terhadap Jumlah Trombosit pada Mencit *Ulcerative Colitis* (UC)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian vitamin D terhadap penurunan jumlah trombosit pada mencit model *ulcerative colitis* (UC). Pada penelitian ini, hewan coba menggunakan 21 mencit BALB/c yang dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol negatif (-), kelompok kontrol positif (+), dan kelompok perlakuan. Perlakuan pada mencit berlangsung selama 22 hari dari pemberian DSS 3% hingga pembedahan mencit dilakukan. Setelah dilakukan pembedahan, sampel darah kemudian diambil dan dibawa ke laboratorium patologi klinik (PK) untuk mengetahui jumlah trombosit tiap-tiap kelompok perlakuan mencit. Hasil yang didapatkan pada penelitian ini untuk masing-masing tiap

kelompok perlakuan berupa kadar trombosit pada darah mencit BALB/c yang dijelaskan dalam gambar 5.1.

Gambar 5.2 Rerata Jumlah Trombosit Mencit BALB/c ($\times 10^3/\text{mm}^3$)



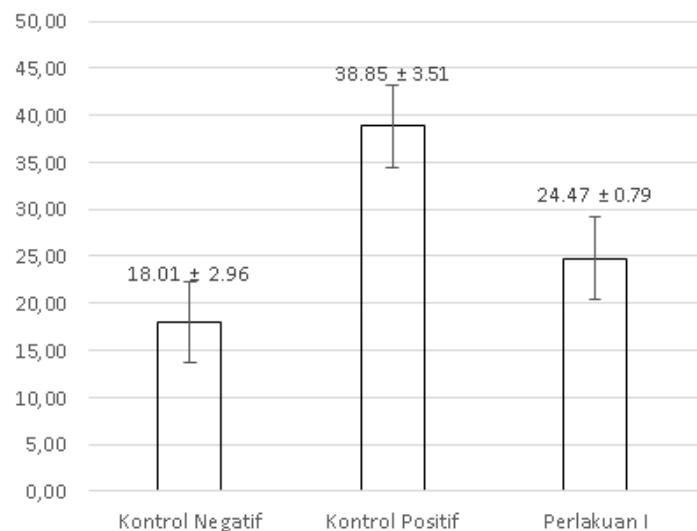
Kelompok yang pertama adalah kelompok kontrol negatif(-) yaitu mencit yang diberi diet pakan AIN (*American Institute of Nutrition*) normal. Kelompok yang kedua adalah kelompok kontrol positif(+) yaitu mencit yang diberi diet pakan AIN dan diberi DSS 3% melalui botol minum mencit selama dua hari sekali. Kelompok yang ketiga adalah kelompok perlakuan yaitu mencit yang diberi diet pakan AIN dan diberi DSS 3% melalui botol minum mencit selama dua kali sehari selama satu minggu lalu satu minggu selanjutnya DSS 3% diganti dengan vitamin D dosis 0.2 μg /25 gBB/hari melalui sonde. Pengukuran kadar trombosit dilakukan terhadap kelompok K (-), K (+), dan perlakuan dengan menggunakan metode kolorimetri dari darah mencit BALB/c yang dibedah pada hari ke-22.

Dari data diatas menginformasikan bahwa kelompok mencit normal yang tidak diterapi dengan vitamin D memiliki rata-rata jumlah trombosit sebesar 875.00 x

$10^3/\text{mm}^3$. Kelompok mencit model UC dengan induksi DSS 3% tanpa terapi memiliki rata-rata jumlah trombosit sebesar $974.29 \times 10^3/\text{mm}^3$. Selanjutnya kelompok mencit model UC dengan induksi DSS 3% kemudian diterapi dengan vitamin D dosis $0.2 \mu\text{g}/25 \text{ gBB}/\text{hari}$ memiliki rata-rata jumlah trombosit sebesar $708.71 \times 10^3/\text{mm}^3$.

Jumlah trombosit berbanding lurus dengan jumlah IL-6. Semakin jumlah IL-6 tinggi maka jumlah trombosit juga akan tinggi. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan ekspresi dari kadar IL-6 pada mencit UC kontrol (+) dengan jumlah 38.85 pg/ml, kontrol (-) sebesar 18.01 pg/ml, dan kelompok perlakuan sebesar 24.78 pg/ml.

Gambar 5.3 Rerata Jumlah IL-6 pada Mencit BALB/c (pg/ml)



5.2 Analisis Data

Pengujian pengaruh pemberian vitamin D terhadap jumlah trombosit dari darah mencit BALB/c menggunakan *software SPSS* versi 23 dengan metode *one-way ANOVA* karena variabel bebas pada penelitian ini berjumlah lebih dari dua yaitu

K (-), K (+), dan perlakuan. Syarat dari uji *one-way ANOVA* adalah terpenuhinya uji normalitas dan homogenitas data.

5.2.1 Uji Normalitas

Dari hasil pengamatan sampel penelitian, dilakukan uji normalitas data untuk mengetahui distribusi/sebaran data. Uji normalitas dilakukan menggunakan *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel penelitian yang kurang dari 50. Hasil uji normalitas pengaruh pemberian vitamin D terhadap penurunan jumlah trombosit pada mencit model UC menunjukkan bahwa nilai signifikansi untuk semua kelompok > 0.05 . Hal ini menunjukkan bahwa keseluruhan data berdistribusi normal.

5.2.2 Uji Homogenitas

Uji homogenitas data merupakan uji untuk mengetahui bahwa sekumpulan data memiliki kesamaan ragam antar kelompok atau tidak. Uji homogenitas data pada penelitian ini menggunakan *Levene Statistic*. Uji homogenitas data kadar trombosit mencit BALB/c menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.310 yang lebih besar dari nilai α 0.05 ($p > 0.05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa data trombosit mencit BALB/c tersebut dinyatakan memiliki ragam yang homogen. Dengan demikian dapat dilakukan pengujian *One Way Anova* karena asumsi homogenitas ragam data telah terpenuhi.

5.2.3 One-way ANOVA

Berdasarkan uji *one-way ANOVA* didapatkan nilai signifikansi sebesar 0.025. Dalam hal ini nilai signifikansi < 0.05 yang menyatakan bahwa ada perbedaan pengaruh yang signifikan pada pemberian vitamin D terhadap penurunan jumlah

trombosit pada mencit model *Ulcerative Colitis*. Untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjutan yaitu dengan menggunakan *Least Significant Difference* (LSD) dengan kriteria bahwa apabila satu pasang perlakuan menghasilkan nilai signifikansi <0.05 maka dapat dinyatakan terdapat perbedaan pengaruh pemberian vitamin D terhadap penurunan jumlah trombosit pada mencit model *Ulcerative Colitis*. Hasil analisis LSD berdasarkan penelitian adalah sebagai berikut :

Tabel 5.2 Hasil Analisis LSD

Perlakuan	Rata-Rata	Probabilitas		
		P	K-	K+
P	708.71	-	0.078	0.008
K-	875.00	0.078	-	0.279
K+	974.29	0.008	0.279	-

Hasil analisis di atas menginformasikan bahwa kelompok mencit model UC dengan induksi DSS 3% tanpa terapi memiliki jumlah trombosit yang paling tinggi dan berbeda signifikan dengan kelompok mencit model UC dengan induksi DSS 3% kemudian diterapi dengan vitamin D dosis $0.2 \mu\text{g} / 25 \text{ gBB/hari}$. Namun berbeda tidak signifikan dengan jumlah trombosit pada kelompok mencit normal yang tidak diterapi dengan vitamin D, yang berarti jumlah trombosit pada kelompok K (+) mengalami peningkatan dari kelompok K (-) tetapi dalam jumlah yang masih batas normal yang menunjukkan belum ada aktivitas kolitis yang berarti. Sedangkan kelompok mencit model UC dengan induksi DSS 3% dan diterapi dengan vitamin D dosis $0.2 \mu\text{g} / 25 \text{ gBB/hari}$ memiliki jumlah trombosit yang paling rendah dan berbeda signifikan dengan kelompok mencit model UC dengan induksi DSS 3% tanpa terapi, namun berbeda tidak signifikan dengan kelompok mencit normal yang tidak diterapi dengan vitamin D.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Karakteristik Mencit Model *Ulcerative Colitis* (UC)

6.1.1 Karakteristik Berat Badan, Konsistensi Feses, dan Perdarahan Feses

Untuk mendapatkan mencit model *ulcerative colitis* (UC) maka digunakan induksi dari *dextran sulphate sodium* (DSS) yaitu suatu zat kimia yang larut air dengan muatan negatif dengan berat molekular berkisar 5 hingga 1400 kDa. *dextran sulphate sodium* dalam menginduksi UC bekerja dengan cara merusak epitel monolayer yang melapisi usus besar sehingga terjadi inflamasi. *Dextran sulphate sodium* pada mencit diberikan melalui air minum dengan campuran DSS sebanyak 3% (Chassaing *et al.*, 2014). Selama proses induksi mencit menjadi UC ada beberapa hal yang harus dimonitor pada mencit setiap harinya, yakni berat badan mencit, konsistensi feses, dan adanya darah pada feses mencit (perdarahan rektal). Jika mencit telah terinduksi oleh DSS maka berat badan mencit akan mengalami penurunan dan akan didapatkan darah pada feses mencit (Chassaing *et al.*, 2014; Lagishetty *et al.*, 2010). Untuk mengetahui derajat keparahan UC sendiri, maka digunakanlah skor *disease activity index* (DAI) (Park *et al.*, 2015).

Hasil penelitian pada mencit untuk kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan menggunakan skor DAI didapatkan skor 0 yang berarti tidak didapatkan adanya penurunan berat badan, konsistensi feses masih dalam batasan normal, dan tidak didapatkan adanya perdarahan pada feses. Skor 0 DAI tersebut menjelaskan

bahwa mencit kelompok kontrol negatif dan mencit kelompok perlakuan menunjukkan kondisi yang sehat. Sedangkan untuk kelompok kontrol positif yang diinduksi dengan DSS 3% dan tanpa pemberian vitamin D didapatkan adanya penurunan berat badan sebesar 1.12% dan menunjukkan skor 1 pada DAI yakni didapatkan penurunan berat badan 1 – 5%, konsistensi feses menunjukkan skor 1 yakni *loose stool*, dan untuk perdarahan feses mendapatkan skor 0 yang berarti tidak ada perdarahan feses. Menurut skor DAI, penjumlahan dari ketiga skor diatas untuk kelompok kontrol positif menunjukkan angka 0.667 yang menjelaskan bahwa terdapat aktivitas *colitis* dalam batas yang minimal. Menurut penelitian Perse dan Cerar pada tahun 2012 yang berjudul “*Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks*” yang menunjukkan bahwa DSS menginduksi terjadinya UC sangat bergantung terhadap banyak hal, seperti DSS itu sendiri (konsentrasi, berat molekular, dan durasi keterpaparan terhadap DSS), genetika (strain dan substrain, jenis kelamin hewan), dan mikrobiologi (status mikrobiologi dan flora normal yang ada di usus). Sedangkan untuk onset dan keparahan dari *colitis* sendiri juga sangat bergantung pada berbagai macam faktor, salah satunya adalah stres (Perse dan Cecar, 2012). Dosis untuk membuat UC akut menurut Chassaing *et al* tahun 2014 yang berjudul “*Dextran Sulfate Sodium (DSS) Induced Colitis in Mice*” bahwa dosis DSS sebesar 2% - 5% merupakan dosis untuk menginduksi UC akut, sehingga dengan dosis yang kurang maksimal tersebut kurang mampu untuk menimbulkan aktivitas kolitis yang berat (Chassaing *et al.*, 2014).

Berdasarkan *skor mouse colitis histology index* (MCHI) didapatkan skor 8 yang menandakan adanya aktivitas kolitis pada mencit UC yang diinduksi DSS dan

hal ini sesuai dengan penelitian Koelink *et al* tahun 2018 yang berjudul “Development of Reliable, Valid and Responsive Scoring Systems for Endoscopy and Histology in Animal Models for Inflammatory Bowel Disease” menyatakan bahwa dikatakan adanya aktivitas kolitis berdasarkan skor histologi adalah berkisar 8 – 13.

6.1.2 Karakteristik Trombosit pada Mencit Model Ulcerative Colitis (UC)

Pada mencit model *ulcerative colitis* (UC) terjadi suatu inflamasi pada mukosa usus akibat adanya zat-zat asing yang mengiritasi mukosa usus seperti molekul DSS. Proses inflamasi usus tersebut membuat dilepaskannya sitokin-sitokin pro inflamasi dan menghambat pelepasan sitokin-sitokin anti inflamasi. Salah satu sitokin pro inflamasi yang terlibat pada proses *colitis* adalah Interleukin-6 (IL-6) (Perse dan Cerar, 2012; Randhawa *et al.*, 2014). Jumlah IL-6 normal didalam tubuh adalah ≤ 40 pg/ml (Stenina *et al.*, 2011). Berdasarkan hasil penelitian didapatkan jumlah trombosit pada kelompok kontrol (+) sebesar 38.85 dan kontrol (-) sebesar 18.01 yang artinya kadar IL-6 pada kontrol (+) lebih tinggi daripada kontrol (-) tetapi masih dalam batas normal, sedangkan kelompok perlakuan setelah diberikan vitamin D jumlah IL-6 mengalami penurunan menjadi 24.78 tetapi memang masih dalam batas normal. Efek yang terjadi dari banyaknya IL-6 didalam darah adalah bahwa IL-6 menstimulasi proses trombopoiesis di hepar untuk merangsang sel progenitor trombosit yaitu megakariosit untuk memproduksi trombosit secara besar-besaran didalam darah. Hal tersebut membuat terjadinya peningkatan jumlah trombosit didalam darah yang dikenal sebagai suatu keadaan trombositosis (Zhang,

2014; Vandoukis *et al.*, 2013). Keadaan ini jika dibiarkan akan membentuk suatu trombus dan akan membuat manifestasi ekstra intestinal melalui arteri dan vena yang biasa dikenal sebagai *deep vein thrombosis* (DVT) atau menuju ke paru menjadi emboli paru, dan semua kondisi tersebut akan mengakibatkan kematian (Yan SL *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2018).

Selain itu, trombositosis yang terjadi pada keadaan UC memiliki korelasi dengan mencit UC yang mengalami anemia defisiensi besi. Kekurangan zat besi didalam tubuh akan memicu peningkatan sel progenitor megakariosit untuk memproduksi trombosit lebih banyak lagi. Karena proses produksi trombosit yang harus segera meningkat maka trombosit yang dikeluarkan oleh megakariosit merupakan trombosit yang *immature* (Vandoukis *et al.*, 2013).

Nilai normal dari trombosit mencit jenis BALB/c adalah 515 hingga 1150 x 10³/mm³ (Barrios *et al.*, 2009). Berdasarkan hasil penelitian jumlah trombosit mencit model UC pada kelompok kontrol negatif yakni tidak diberikan DSS maupun vitamin D memiliki rata-rata sebesar 875 x 10³/mm³, jumlah tersebut masih masuk dalam rentangan nilai normal. Untuk kelompok kontrol positif yakni diberi minum DSS 3% dan tanpa diberikan vitamin D dosis 0.2 µg/25 g/hari memiliki rata-rata kadar trombosit sebesar 974.29 x 10³/mm³. Jumlah trombosit tersebut masih didalam rentangan jumlah trombosit normal tetapi melebihi jumlah trombosit kontrol negatif. Sedangkan untuk kelompok perlakuan rata-rata jumlah trombosit mencit model UC sebesar 708.71 x 10³/mm³ yang memiliki arti bahwa jumlah tersebut masih dalam rentangan nilai normal tetapi memiliki rata-rata yang paling rendah jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif maupun kontrol positif. Menurut Danese *et al* pada

tahun 2004 yang berjudul "*Platelets in Inflammatory Bowel Disease: Clinical, Pathogenic, and Therapeutic Implications*" menunjukkan bahwa tingginya jumlah *platelet* yang melebihi normal sangat berkorelasi dengan keparahan dari penyakit usus itu sendiri, yakni semakin parah atau semakin kronis dari penyakit usus itu maka angka *platelet* akan semakin melebihi normal (Danese *et al.*, 2004). Dari penelitian Danese *et al* tersebut berkaitan dengan dosis DSS yang digunakan untuk menginduksi terjadinya UC, yakni dosis 3% merupakan dosis DSS untuk menginduksi UC akut, dan hal ini sesuai dengan penelitian menurut Chassaing *et al* tahun 2014 yang berjudul "Dextran Sulfate Sodium (DSS) Induced Colitis in Mice" menjelaskan bahwa dosis DSS sebesar 2% - 5% merupakan dosis untuk menginduksi UC akut (Chassaing *et al.*, 2014). Sedangkan manifestasi dari trombositosis merupakan manifestasi dari UC kronik dan hal ini sesuai dengan penelitian Polinska *et al* pada tahun 2011 yang berjudul "*Assessment of the influence of the inflammatory process on the activation of blood platelets and morphological parameters in patients with ulcerative colitis (colitis ulcerosa)*" menyatakan bahwa inflamasi kronis pada pasien UC menyebabkan peningkatan jumlah dari *platelet* darah dan perubahan bentuk *platelet* (Polinska *et al.*, 2011).

6.2 Pengaruh Pemberian Vitamin D terhadap Jumlah Trombosit

Vitamin D merupakan vitamin yang larut dalam lemak dan memiliki bentuk aktif yaitu *calcitriol* atau *1,25-dihydroxyvitamin D3* ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). Vitamin D juga memiliki pengaruh pada fungsi sistem imun tubuh dan kekurangan vitamin D didalam tubuh dapat dikenali sebagai suatu faktor risiko untuk penyakit autoimun.

Vitamin D dan regulasinya pada sistem imun adalah bahwa *vitamin D receptor* (VDR) terletak hampir diseluruh sel imun seperti sel CD4+ yang aktif maupun *naive*, sel CD8+, sel B, neutrofil, dan sel APC seperti sel dendritik dan makrofag. Vitamin D3 terutama meningkatkan respon kemotaktik dan fagosit dari makrofag, menghambat ekspresi antigen kompleks dari MHC kelas II dan menurunkan regulasi dari produksi sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6, IL-8, dan TNF- α (Ardesia *et al.*, 2015). Terkait dengan fungsi vitamin D dalam menghambat sitokin pro-inflamasi yakni seperti IL-6 maka akan berdampak pada terjadinya penurunan jumlah trombosit di darah karena IL-6 merupakan sitokin pro-inflamasi yang bisa meningkatkan regulasi dari hormon trombopoetin yang mana akan membuat produksi sel progenitor trombosit yakni megakariosit didalam darah akan mengalami peningkatan dan akan terjadi proses pengeluaran trombosit yang meningkat juga oleh megakariosit yang disebut sebagai suatu kondisi trombositosis (Vandoukis *et al.*, 2013). Pada penelitian ini dilakukan pengujian pengaruh pemberian vitamin D terhadap mencit model *ulcerative colitis* (UC).

Ulcerative colitis merupakan suatu kondisi inflamasi yang terbatas pada permukaan mukosa usus besar. Inflamasi yang terjadi disebabkan oleh karena adanya zat-zat yang mengiritasi lapisan epitel usus besar sehingga antigen dapat masuk kedalam usus besar dan terjadilah suatu proses inflamasi yang menyebabkan terjadi gangguan juga pada sel T regulator dan sel T efektor sehingga sitokin pro-inflamasi lebih banyak jumlahnya dibandingkan sitokin anti-inflamasi (Ordas *et al.*, 2012). Salah satu sitokin pro inflamasi yang berperan dalam terjadi UC adalah IL-6. Semakin banyak sitokin IL-6 didalam darah maka semakin meningkat

pula produksi trombosit di dalam darah. Sitokin IL-6 bekerja dengan meningkatkan regulasi hormon trombopoetin dan hormon ini akan merangsang produksi sel progenitor trombosit dan akan terjadi produksi trombosit yang berlebihan didalam darah. Selain itu, trombositosis yang terjadi pada keadaan UC memiliki korelasi dengan mencit UC yang mengalami anemia defisiensi besi. Kekurangan zat besi didalam tubuh akan memicu peningkatan sel progenitor megakariosit untuk memproduksi trombosit lebih banyak lagi. Karena proses produksi trombosit yang harus segera meningkat maka trombosit yang dikeluarkan oleh megakariosit banyak yang *immature* (Vandoukis *et al.*, 2013).

Pada penelitian ini digunakan penanda trombosit untuk menilai manifestasi klinis tromobositosis dari *Ulcerative Colitis*. Peningkatan kadar trombosit diluar interval normalnya menunjukkan adanya trombositosis pada *ulcerative colitis*. Hal ini dapat diketahui bila terjadi peningkatan kadar trombosit yang berarti yang disebabkan karena terjadinya peningkatan sitokin pro-inflamasi khususnya dalam hal ini adalah IL-6. Pada penelitian ini UC dapat diterapi dengan pemberian vitamin D yang memiliki efek salah satunya sebagai anti-inflamasi, yaitu apakah sitokin pro-inflamasi khususnya IL-6 berhasil ditekan jumlahnya oleh vitamin D atau tidak. Jika vitamin D berhasil menekan jumlah sitokin pro-inflamasi khususnya IL-6, maka trombosit dalam darah jumlahnya akan berkurang dan kembali ke normal (Reich *et al.*, 2014).

Dari hasil penelitian tentang uji pemberian vitamin D terhadap jumlah trombosit didapatkan perhitungan rata-rata kadar trombosit mencit setiap kelompok perlakuan, kelompok kontrol negatif yang diberi air minum aquades tanpa dicampur

DSS 3% dan tanpa pemberian vitamin D memiliki rata-rata kadar trombosit $875 \times 10^3/\text{mm}^3$. Rata-rata kadar trombosit pada kelompok kontrol negatif ini masih dalam batas normal. Kelompok kontrol positif yang diberi minum DSS 3% dan tanpa diberikan vitamin D dosis $0.2 \mu\text{g}/25 \text{ gBB}/\text{hari}$ memiliki rata-rata kadar trombosit $974.29 \times 10^3/\text{mm}^3$. Rata-rata kadar trombosit pada kelompok kontrol positif ini masih dalam batasan normal tetapi diatas dari kelompok negatif. Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (-) maupun kelompok kontrol (+), kadar trombosit pada kelompok perlakuan 1 yaitu diberi minum DSS 3% dan diberikan vitamin D dosis $0.2 \mu\text{g}/25 \text{ gBB}/\text{hari}$ memiliki nilai dibawah rerata kelompok kontrol (-) maupun kelompok kontrol (+) yaitu sebesar $708.71 \times 10^3/\text{mm}^3$ yang masih merupakan rerata dalam batasan yang normal. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Reich *et al* tahun 2014 yang berjudul " *Vitamin D improves inflammatory bowel disease outcomes. Basic science and clinical review* " yang menyatakan bahwa vitamin D menekan proliferasi dan menurunkan regulasi dari sitokin pro-inflamasi seperti *tumour necrosis alpha* (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 (IL-1), dan interleukin-8 (IL-8) serta dapat meningkatkan regulasi sitokin anti inflamasi seperti interleukin 10 (IL-10) dan *transforming growth factor*- β (GF- β).

Dari hasil penelitian ini didapatkan nilai signifikansi data kadar trombosit pada mencit BALB/c jantan ($p=0.025$) melalui uji *One-way ANOVA*. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat pengaruh pemberian vitamin D terhadap jumlah trombosit pada mencit model *Ulcerative Colitis* (UC). Rerata trombosit kelompok yang diberi vitamin D dengan dosis $0.2 \mu\text{g}/25 \text{ gBB}/\text{hari}$ adalah $708.71 \times 10^3/\text{mm}^3$. Jika dilakukan uji beda *post hoc* LSD dengan kelompok kontrol negatif didapatkan kelompok signifikansi

$p=0.279$. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan antara kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan yang diberi vitamin D dosis $0.2 \mu\text{g}/25 \text{ gBB}/\text{hari}$. Adapun uji beda LSD dengan kelompok kontrol positif didapatkan signifikansi $p=0.008$ atau dengan kata lain terdapat perbedaan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan yang diberikan vitamin D dosis $0.2 \mu\text{g}/25 \text{ gBB}/\text{hari}$.

Penurunan jumlah trombosit pada mencit model UC dapat terjadi karena adanya penurunan sitokin pro-inflamasi khususnya IL-6 pada saat diberikan vitamin D. Hal tersebut disebabkan karena vitamin D memiliki efek anti-inflamasi yang mana bekerja dengan cara menurunkan regulasi sitokin pro-inflamasi seperti IL-6, $\text{TNF-}\alpha$, IL-17, dan $\text{INF-}\gamma$ serta meningkatkan regulasi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10. Berdasarkan uraian diatas, maka hipotesis bahwa pemberian vitamin D terhadap mencit BALB/c jantan model UC dapat menurunkan jumlah trombosit dinyatakan terbukti.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan antara lain tidak didapatkan adanya pengukuran kadar vitamin D sebelum dan sesudah diberi perlakuan serta tidak didapatkan adanya pengukuran jumlah IL-6 sebelum perlakuan.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Terdapat penurunan jumlah trombosit pada mencit model *Ulcerative Colitis* (UC) yang diberikan terapi vitamin D. Kadar trombosit pada mencit model UC lebih tinggi daripada mencit normal dan mencit model UC yang diberi terapi vitamin D.

7.2 Saran

Saran yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

- 1) Penelitian selanjutnya diperlukan untuk mengukur kadar IL-6 pada mencit model *ulcerative colitis* sebelum perlakuan.
- 2) Dilakukan penelitian lanjutan mengenai kadar vitamin D pada mencit model *ulcerative colitis* sebelum dan sesudah perlakuan.
- 3) Diperlukan untuk membuat mencit model *ulcerative colitis* yang kronis untuk penelitian selanjutnya agar bisa melihat manifestasi trombositosis

DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, C., Cho, J. H. 2009. *Inflammatory Bowel Disease*. The New England Journal of Medicine.
- Andrade, A. R., Barros, L. L., Azevedo, M. F. C., Carlos, A. S., Damião, A. O. M. C., Sipahi, A. M., & Leite, A. Z. A. 2018. *Risk of thrombosis and mortality in inflammatory bowel disease*. Clinical and Translational Gastroenterology.
- Ardesia, M., Ferlazzo, G., & Fries, W. 2015. *Vitamin D and Inflammatory Bowel Disease*. BioMed Research International.
- Bancil, A., & Poullis, A. 2015. *The Role of Vitamin D in Inflammatory Bowel Disease*. Healthcare.
- Bikle, D. D. 2014. *Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications*. Chemistry & Biology.
- Blanck, S., & Aberra, F. 2013. *Vitamin D Deficiency Is Associated with Ulcerative Colitis Disease Activity*. Digestive Diseases and Sciences.
- Cannell, J. J., Grant, W. B., & Holick, M. F. 2014. *Vitamin D and inflammation*. Dermato-Endocrinology.
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Vijay-Kumar, M. 2014. *Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice*. Current Protocols in Immunology.
- Christakos, S., Ajibade, D. V., Dhawan, P., Fechner, A. J., & Mady, L. J. 2010. *Vitamin D: Metabolism*. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.
- Cioffi, M. 2015. *Laboratory markers in ulcerative colitis: Current insights and future advances*. World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology.
- Collins, P., & Rhodes, J. 2006. *Ulcerative colitis: diagnosis and management*. BMJ.

- Conrad, K., Roggenbuck, D., & Laass, M. W. 2014. *Diagnosis and classification of ulcerative colitis*. Autoimmunity Reviews.
- Danese, S., & Fiocchi, C. 2011. *Ulcerative Colitis*. New England Journal of Medicine.
- Das, U. N. 2016. *Inflammatory bowel disease as a disorder of an imbalance between pro- and anti-inflammatory molecules and deficiency of resolution bioactive lipids*. Lipids in Health and Disease.
- Eichele, D. D., Kharbanda, K. K., 2017. *Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis*. World Journal of Gastroenterology.
- El-Moneim, A. A., Kratz, C. P., Böll, S., Rister, M., Pahl, H. L., & Niemeyer, C. M. 2007. *Essential versus reactive thrombocythemia in children: Retrospective analyses of 12 cases*. Pediatric Blood & Cancer.
- Fakhoury, M., Al-Salami, H., Negrulj, R., & Mooranian, A. 2014. *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments*. Journal of Inflammation Research.
- Farrell, R. J., & Peppercorn, M. A. 2002. *Ulcerative colitis*. The Lancet.
- Feuerstein, J. D., & Cheifetz, A. S. 2014. *Ulcerative Colitis: epidemiology, diagnosis, and management*. Mayo Clinic Proceedings.
- Garud, S., & Peppercorn, M. A. 2009. *Review: Ulcerative colitis: current treatment strategies and future prospects*. Therapeutic Advances in Gastroenterology.
- Gremmel, T., Frelinger, A. L., Michelson, A. D. 2016. *Platelet Physiology*. Seminars in Thrombosis and Hemostasis.
- Guan, Q., & Zhang, J. 2017. *Recent Advances: The Imbalance of Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease*. Mediators of Inflammation.
- Gubatan, J., Mitsuhashi, S., Longhi, M. S., Zenlea, T., Rosenberg, L., Robson, S., & Moss, A. C. 2018. *Higher serum vitamin D levels are associated with protective serum cytokine profiles in patients with ulcerative colitis*. Cytokine.

- Hendrickson, B. A., Gokhale, R., Cho, J. H. 2002. *Clinical Aspects and Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease*. Clinical Microbiology Reviews.
- Holinstat, M. 2017. *Normal platelet function*. Cancer and Metastasis Reviews.
- Hwang, J. M., Varma, M. G., 2008. *Surgery for inflammatory bowel disease*. World Journal of Gastroenterology.
- Kaushansky, K. 2005. *The molecular mechanism that control thrombopoiesis*. Journal of Clinical Investigation.
- Kim, D. H., Cheon, J. H. 2017. *Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Recent Advanced in Biologic Therapies*. Immune Network.
- Koelink. P. J., Wildenberg. M. E., Stitt. L. W., Feagan. B. G., Koldijk. M., Wout. A. B., Atreya. R., Vieth. M., Brandse. J. F., Duijst. S., Velde. A. A., D'Hans. G. R. A. M., Levesque. B. G., & van den Brink. G. R. 2018. *Development of Reliable, Valid and Responsive Scoring System for Endoscopy and Histology in Animal Models for Inflammatory Bowel Disease*. Journal of Crohn's and Colitis.
- Kornbluth, A., & Sachar, D. B. 2010. *Ulcerative Colitis Practice Guidelines in Adults: American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee*. The American Journal of Gastroenterology.
- Kozuch, L. P., Hanauer, B. S., 2008. *Treatment of inflammatory bowel disease: A review of medical therapy*. World Journal of Gastrointestinal Surgery.
- Krishnegowda, M., Rajashekaraiah, V. 2015. *Platelet disorders*. Blood Coagulation and Fibrinolysis.
- Lagishetty, V., Misharin, A. V., Liu, A. Q., Lisse, T. S., Chun, R. F., Ouyang, Y., McLachlan, S. M., Adams, J. S., Hewison, M. 2010. *Vitamin D Deficiency in Mice Impairs Colonic Antibacterial Activity and Predisposes to Colitis*. Endocrinology.

- Larson, D. W., Pemberton, J. H., 2004. *Current concepts and controversies in surgery for IBD*. Gastroenterology.
- Li, J., Chen, N., Wang, D., Zhang, J., & Gong, X. 2018. *Efficacy of vitamin D in treatment of inflammatory bowel disease*. Medicine.
- Limketkai, B. N., Mullin, G. E., Limsui, D., & Parian, A. M. 2016. *Role of Vitamin D in Inflammatory Bowel Disease*. Nutrition in Clinical Practice.
- Lynch, W. D., Hsu, R. 2018. *Colitis Ulcerative*. StatPearls Publishing LLC.
- M'Koma A. E. 2014. *Diagnosis of inflammatory bowel disease: Potential role of molecular biometrics*. World Journal of Gastrointestinal Surgery.
- M'koma, A. E. 2013. *Inflammatory Bowel Disease: An Expanding Global Health Problem*. Clinical Medicine Insights: Gastroenterology.
- Meeker, S., Seamons, A., Price, L. M., Paik, J. 2016. *Protective links between vitamin D, inflammatory bowel disease and colon cancer*. World Journal of Gastroenterology.
- Moller, F. T., Andersen, V., Wohlfahrt, J., & Jess, T. 2015. *Familial Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Cohort Study 1977–2011*. The American Journal of Gastroenterology.
- Mustika, S., Triana, N. 2016. *The Prevalence, Profile, and Risk Factor of Patients with Ulcerative Colitis at Dr. Saiful Anwar Malang General Hospital*. The Indonesian Journal of Gastroenterology, Hepatology and Digestive Endoscopy.
- Neurath, M. 2010. *Thiopurines in IBD*. Gastroenterology and Hepatology.
- Ninos, J. M., Jefferies, L. C., Cogle, C. R., Kerr, W. G. 2006. *The thrombopoietin receptor, c-Mpl, is a selective surface marker for human hematopoietic stem cells*. Journal of Translational Medicine.

- O'Connel, K. E., Mikkola, A. M., Stepanek, A. M., Vernet, A., Hall, C. D., Sun, C. C., Yildirim, E., Staropoli, J. F., Lee, J. T., Brown, D. E. 2015. *Parctical Murine Hematopathology: A Comparative Review and Implications for Research*. Comparative Medicine.
- Ordás, I., Eckmann, L., Talamini, M., Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. 2012. *Ulcerative colitis*. The Lancet.
- Park, Y. H., Kim, N., Shim, Y. K., Choi, Y. J., Nam, R. H., Choi, Y. J., Ham, M. H., Suh, J. H., Lee, S. M., Lee, C. M., Yook, H., Lee, H. S., Lee, D. H. 2015. *Adequate Dextran Sulfate-induced Colitis Model in Mice and Effective Outcome Measurement Method*. Journal of Cancer Prevention Vol. 20, No. 4.
- Perse, M., Cerar, A., 2012. *Dextran sodium sulphate colitis mouse model:traps and tricks*. Journal of Biomedicine and Bioethanology.
- Probert, C. 2012. *Steroids and 5-aminosalicylic acids in moderate ulcerative colitis: addressing the dilemma*. Therapeutic Advances in Gastroenterology.
- Rameshshanker, R., Arebi, N. 2012. *Endoscopy in inflammatory bowel disease when and why*. World journal of Gastrointestinal Endoscopy.
- Randhawa, P. K., Singh, K., Singh, N., Jaggi, A. S., 2014. *A Review on Chemical-Induced Inflammatory Bowel Disease Models in Rodents*. Korean Journal of Physiology and Pharmacology.
- Reich, K. M., Fedorak, R. N., Madsen, K., Kroeker, K. I., 2014. *Vitamin D improves inflammatory bowel disease outcomes. Basic science and clinical review*. World Journal of Gastroenterology.
- Sheila M. Wilhel, Bryan L. Love. 2017. *Management of patients with inflammatory bowel disease: current and future treatments*. Clinical Pharmacist.
- Sica, G. S., Biancone, L. 2013. *Surgery for inflammatory bowel disease in the era of laparoscopy*. World Journal of Gastroenterology.
- Stenina, M. A., Krivov. L. I., Voevodin. D. A., Savchuk. V. I., Kovalchuk. L. V., & Yarygin. V. N. 2011. *Cytokine Profile of the Blood in Mice with Normal and Abnormal Heart Rhythm*. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, Vol. 152, No. 6.

- Voudoukis, E., Karmiris, K., Oustamanolakis, P., Theodoropoulou, A., Sfiridaki, A., Paspatis, G. A., & Koutroubakis, I. E. 2013. *Association between thrombocytosis and iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease*. European Journal of Gastroenterology & Hepatology.
- Wehkamp, J., Götz, M., Herrlinger, K., Steurer, W., & Stange, E. F. 2016. *Inflammatory Bowel Disease: Crohn's disease and ulcerative colitis*. Deutsches Aerzteblatt Online.
- Williams, C., Panaccione, R., Ghosh, S., & Rioux, K. 2011. *Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease*. Therapeutic Advances in Gastroenterology.
- Whittem, C. G., Williams, A. D., & Williams, C. S. 2010. *Murine Colitis Modeling using Dextran Sulfate Sodium (DSS)*. Journal of Visualized Experiments.
- Yan, S. LS., Russell, J., Harris, N. R., Senchenkova, E. Y., Yildirim, A., Granger, D. N., 2013. *Platelet abnormalities during colonic inflammation*. Crohn's & Colitis Foundation of America.
- Ye, Yulan., Pang, Zhi., Chen, Weichang., Ju, Songwen., Zhou, Chunli. 2015. *The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease*. International Journal of Clinical and Experimental Medicine.
- Zhang, Y.-Z., Li, Y.-Y., 2014. *Inflammatory bowel disease: Pathogenesis*. World Journal of Gastroenterology.
- Zhao, H., Zhang, H., Wu, H., Li, H., Liu, L., Guo, J., ... Zhang, X. 2012. *Protective role of 1,25(OH)₂vitamin D₃ in the mucosal injury and epithelial barrier disruption in DSS-induced acute colitis in mice*. BMC Gastroenterology.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Keterangan Kelaikan Etik

	KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI UNIVERSITAS BRAWIJAYA FAKULTAS KEDOKTERAN KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755 http: www.fk.ub.ac.id e-mail: kep.fk@ub.ac.id
KETERANGAN KELAIKAN ETIK ("ETHICAL CLEARANCE")	
No. 434 / EC / KEPK / 12 / 2017	
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN	
JUDUL	: Pengaruh Pemberian Vitamin D Terhadap Perbaikan Mukosa Usus pada Mencit Model <i>Inflammatory Bowel Disease</i>
PENELITI	: dr. Centaura Naila A.C dr. Wenny Prafitriyanti dr. Fiona Paramita Ervin Monica Rara Aulia Refeny Meirine P. Hilma Hanifiati
UNIT / LEMBAGA	: Fakultas Kedokteran – Universitas Brawijaya Malang.
TEMPAT PENELITIAN	: Laboratorium Farmakologi, Patologi Anatomi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
DINYATAKAN LAIK ETIK.	
Malang, 29 DEC 2017  Ketua, Komisi Etik Penelitian Kesehatan Prof. Dr. dr. Moeh. Istiadjid ES, SpS, SpBS (K), M.Hum NIK 160746683	
Catatan : Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)	

Lampiran 2. Analisis Perbedaan Pengaruh Pemberian Vitamin D terhadap Penurunan Jumlah Trombosit pada Mencit Model *Ulcerative Colitis*

Analisis Deskriptif

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Kadar trombosit

Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
kontrol negatif	875,0000	92,19906	7
kontrol positif	974,2857	242,81592	7
DSS + vitamin D	708,7143	124,89157	7
Total	852,6667	193,70527	21

Pengujian Asumsi Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error

Variances^a

Dependent Variable: Kadar trombosit

F	df1	df2	Sig.
1,251	2	18	,310

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Pengujian Asumsi Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Kadar trombosit	,146	21	,200*	,925	21	,111

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Analisis One Way ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Kadar trombosit

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	252085,810 ^a	2	126042,905	4,553	,025
Intercept	15267849,333	1	15267849,333	551,464	,000
Perlakuan	252085,810	2	126042,905	4,553	,025
Error	498348,857	18	27686,048		
Total	16018284,000	21			
Corrected Total	750434,667	20			

a. R Squared = ,336 (Adjusted R Squared = ,262)

Analisis Uji Lanjutan (Post Hoc) dengan BNT

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar_trombosit

LSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol negatif	kontrol positif	-99,2857	88,93986	,279	-286,1414	87,5700
	DSS + vitamin D	166,2857	88,93986	,078	-20,5700	353,1414
kontrol positif	kontrol negatif	99,2857	88,93986	,279	-87,5700	286,1414
	DSS + vitamin D	265,5714*	88,93986	,008	78,7157	452,4271
DSS + vitamin D	+ kontrol negatif	-166,2857	88,93986	,078	-353,1414	20,5700
	kontrol positif	-265,5714*	88,93986	,008	-452,4271	-78,7157

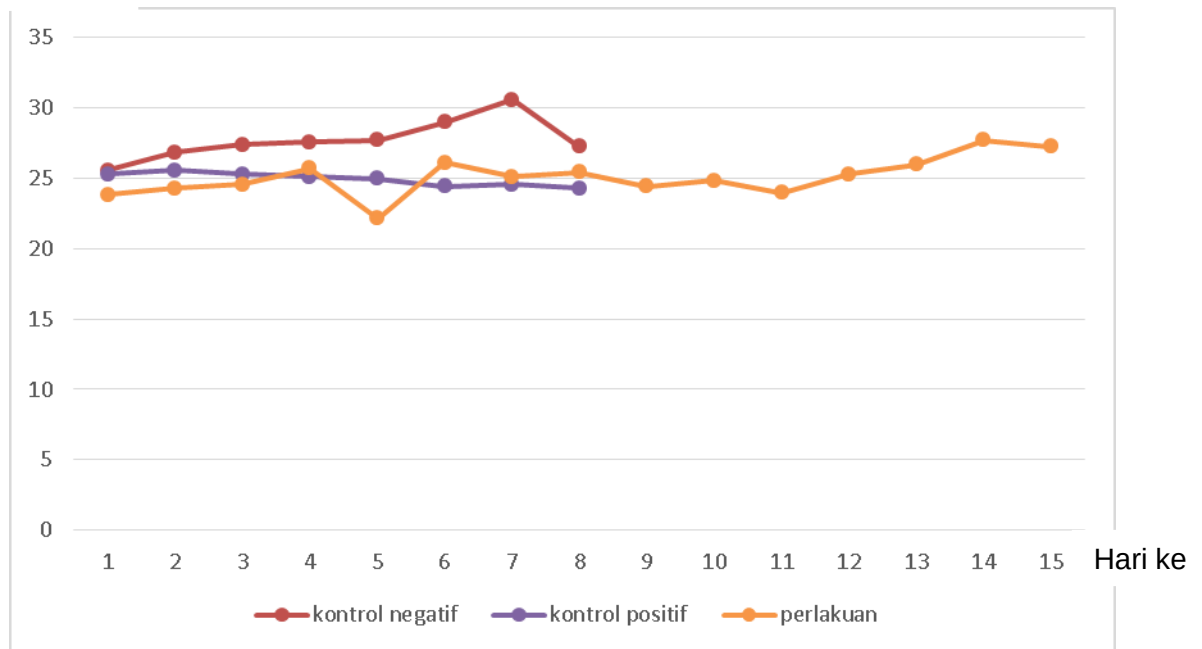
Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 27686,048.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Lampiran 3. Grafik Rata-rata Berat Badan Mencit

Gram BB



Lampiran 4. Proses Induksi Vitamin D Secara Intragastrik



Lampiran 5. Konsistensi Feses Mencit Kelompok Kontrol Positif pada Akhir Perlakuan

